

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Marit Puusepp

**Fotosünteesilist päritolu oligomeersete membraanivalkude barospektroskoopiline uurimus**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad dr Liina Kangur ja prof Arvi Freiberg

TARTU 2015



# Sisukord

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid ja akronüümid.....	5
Sissejuhatus.....	6
<b>1 Kirjanduse ülevaade.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 'e valgust neelav kompleks I.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ja purpurbakterite fotosüntees.....	8
1.1.2 LH1 struktuur.....	10
1.1.3 Valgust neelavate komplekside optiline spektroskoopia.....	13
<b>1.2 Kõrge rõhu tähtsus bioloogias.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Detergendi mõju integraalsele membraanivalgule.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Oligomeersete valkude dissotsiatsioon.....</b>	<b>21</b>
<b>2 Töö eesmärgid ja lähenemisviis.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Materjalid ja meetodid.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Katseobjektid.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Teemantalasi-rõhurakk.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Optilised mõõtesüsteemid.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Andmete töötlemine.....</b>	<b>29</b>
<b>4 Tulemused.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Kõrge rõhu mõju LH1 standardproovile.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Detergendi liiaga destabiliseeritud LH1 dissotsiatsioon kõrge hüdrostaatilise rõhu all.....</b>	<b>33</b>
4.2.1 LH1 ringi dissotsiatsioon heterodimeerideks B825.....	33
4.2.2 LH1 ringi dissotsiatsiooniproduktide fluorestsents.....	35
4.2.3 Heterodimeerse subühiku B825 neeldumisspektri kuju.....	37
4.2.4 Dissotsiatsiooni tetrameerne ( $\alpha_2\beta_2\text{BChl}_4$ ) vaheprodukt B845.....	38
4.2.5 LH1 dissotsiatsioon normaalrõhul.....	39
4.2.6 Dissotsiatsiooni mõju karotenoidi ja valgu spektritele.....	41
<b>5 Arutelu.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Dissotsiatsiooni mehhanism.....</b>	<b>47</b>

5.2	Reaktsiooni järk.....	48
5.3	Dissotsiatsiooni kineetika .....	50
	Kokkuvõte .....	53
	Tänuavaldused .....	55
	A barospectroscopic study of oligomeric membrane proteins of photosynthetic origin .....	56
	Kasutatud kirjanduse loetelu.....	59
	Kasutatud veebiaadressid .....	70
	Lisa 1: Edasist uurimist vajavad protsessid .....	71
	Lisa 1.1. LH1 pöörduv dissotsiatsioon.....	71
	Lisa 1.2. Heterodimeeride pöörduv dissotsiatsioon .....	71
	Lisa 1.3. Hüperkromism .....	73
	Lisa 1.4. Agregeerunud bakterklorofüll .....	74
	Lisa 2. Dissociation of the light-harvesting membrane protein complex I from <i>Rhodobacter sphaeroides</i> under high hydrostatic pressure .....	76
	Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ..	81

## Kasutatud lühendid ja akronüümid

ATP	ingl <i>adenosine triphosphate</i> , adenosiintrifosfaat
BChl	ingl <i>bacteriochlorophyll a</i> , bakterklorofüll a
CCD	ingl <i>Charge-Coupled Device</i> , laengsidestusseadis
CD	ingl <i>Circular Dichroism</i> , tsirkulaarne dikroism
DDM	<i>n</i> -dodetsüül- $\beta$ -D-maltosiid
DHPC	ingl <i>1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> , 1,2-diheptanoüül- <i>sn</i> -glütsero-3-fosfokoliin
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat
E-vektor	elektrivälja vektor
HEPES	4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape
H-side	vesinikside
LH	ingl <i>Light-Harvesting Complex</i> , valgust neelav kompleks
LH1	ingl <i>Light-Harvesting Complex I</i> , valgust neelav kompleks I
LH2	ingl <i>Light-Harvesting Complex II</i> , valgust neelav kompleks II
<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RC	ingl <i>Reaction Centre</i> , reaktsioonitsenter
<i>Rs. rubrum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>

## Sissejuhatus

*Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* on fotosünteesiline purpurbakter. Kuna purpurbakterite fotosünteesiline aparaat on lihtsam ja korrapärasem kui rohelistel taimedel, on nad suurepäraseks mudelorganismid fotosünteesi uurimiseks.

Purpurbakterite fotosünteesi võtmetähtsusega komponendiks on valgust neelavad pigment-valgu kompleksid (LH). Nende pigmendid (bakterklorofüll ja karotenoidid) neelavad elektromagnetkiirgust spektri ultravioletses, nähtavas ja lähi-infrapunases piirkonnas ning kannavad ergastusenergia üle reaktsioonitsentri (RC) pigment-valgu kompleksile, mis muudab valguse energia keemiliste sidemete energiaks (van Amerongen *et al.*, 2000).

Valgust neelav kompleks I (LH1) on oligomeerne integraalne membraanivalk. Membraanivalgud moodustavad ~30% kõigist organismi valkudest (Wallin ja Heijne, 1998), kuid vähem kui 3% teadaoleva struktuuriga valkudest (RCSB Protein Data Bank). Integraalsete membraanivalgude uurimise muudab keerukaks membraani heterogeensus ja tundlikkus keskkonnamõjude suhtes (Seddon *et al.*, 2004). Seepärast isoleeritakse membraanivalke tihti detergendi keskkonda. Detergendi hüdrofoobsed rasvhappejäägid imiteerivad membraani ja võimaldavad integraalsetel membraanivalkudel lahustuda. Siiski pole detergendi keskkond identne natiivse membraaniga. Seda kinnitavad paljud eksperimendid, sh kõrgrõhukatsed (Freiberg *et al.*, 2012; Kangur *et al.*, 2008b).

*Rb. sphaeroides*'e ringikujuline LH1 kompleks koosneb 16 heterodimeersest subühikust (Hu ja Schulten, 1998). Heterodimeer koosneb omakorda  $\alpha$ - ja  $\beta$ - apoproteiinidest (Zuber, 1985) ning nendega mittekovalentselt seotud bakterklorofüll a (BChl) molekulidest (Hu ja Schulten, 1998).

Oligomeersed integraalsed membraanivalgud võivad dissotsieeruda nii keemiliste reagentide (Kawasaki ja Ashwell, 1976) kui temperatuuri toimetel (Ralston *et al.*, 1977). Oligomeersete integraalsete membraanivalgude dissotsiatsiooni rõhu all on vähe uuritud. Kloroplasti ATP-süntaasi dissotsiatsiooni rõhu all on uurinud Souza *et al.* (2004). Linke *et al.* (2008) uurisid dimeerse valgu ToxR dissotsiatsiooni *in vivo*. LH1 dissotsiatsiooni uurimist kõrge hüdrostaatilise rõhu toimetel alustas käesoleva töö autor oma bakalaureusetöös (Puusepp, 2013). Kõrge rõhu mõju uurimine bioloogilistele makromolekulidele annab teavet nende stabiilsuse kohta ning on oluline elu tekke (Trevors, 2002), astrobioloogia (Jakosky ja Shock, 1998), meditsiini (Randolph *et al.*, 2002; St. John *et al.*, 1999) ja toiduainetööstuse (Swientek, 1992) probleemide lahendamiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärk on uurida fotosünteesilist päritolu oligomeerse integraalse membraanivalgu LH1 dissotsiatsiooni kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel optilise spektroskoopia meetoditega. Magistritöö teostati Tartu Ülikooli Füüsika Instituudi biofüüsika laboris.

**Märksõnad:** oligomeerne membraanivalk, LH1, dissotsiatsioon, kõrge hüdrostaatiline rõhk

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 *Rhodobacter sphaeroides*'e valgust neelav kompleks I

### 1.1.1 *Rhodobacter sphaeroides* ja purpurbakterite fotosüntees

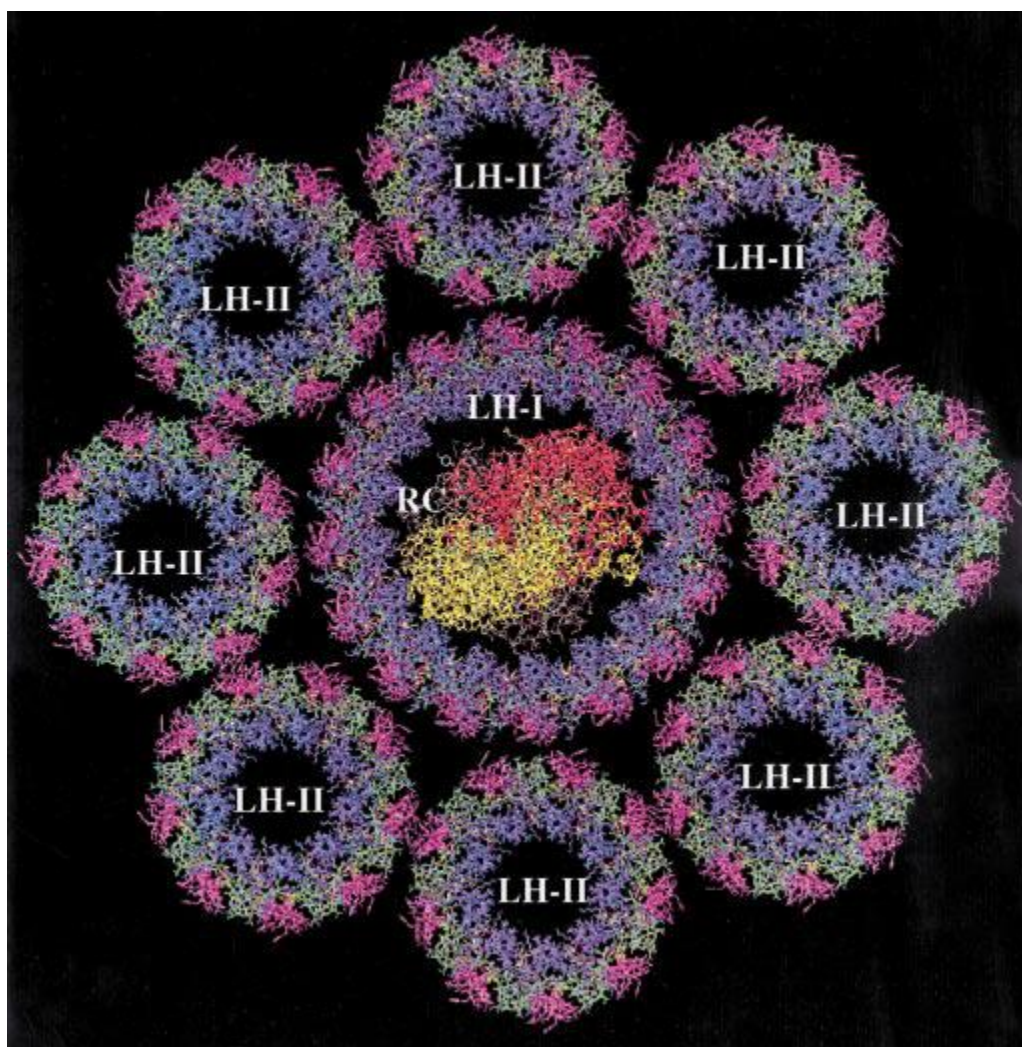
*Rhodobacter sphaeroides* on purpurne mitteväävlibakter, kes asustab siseveekogude anaeroobseid põhjakihte (Pfennig, 1978). Kuna temast kõrgemal elavad klorofüllil sisaldavad rohelised taimed ning vetikad neelavad ära spektri sinise ning punase osa, on *Rb. sphaeroides* kohastunud kasutama spektri rohelist ning lähi-infrapunapiirkonda (Cogdell *et al.*, 2006). Seda spektraalset nišši võimaldavad kasutada fotosünteesilised pigmendid: bakterklorofüll a ja karotenoidid sferoideen ja sferoidenoon (Shneour, 1962).

*Rb. sphaeroides* on üks tuntumaid mudelorganisme purpurbakterite fotosünteesi uurimisel. Purpurbakterite fotosüntees on erinevalt rohelistest taimedest anoksügeenne (Blankenship *et al.*, 1995): fotosünteesi käigus oksüdeeritud bakterklorofüllil ei redutseerita mitte vee molekulide, vaid molekulaarse vesiniku oksüdeerimise arvelt. Seega ei vabane purpurbakterite fotosünteesi käigus hapnikku.

Fotosüntees toimub *Rb. sphaeroides*'e intratsütoplasmaatilistel membraanidel (Blankenship *et al.*, 1995), kus paiknevad valgust neelavad kompleksid, mida ergastavad footonid ja mis kannavad ergastusenergia üle reaktsioonitsentritele. Reaktsioonitsenter on ka ise selle koosseisu kuuluvate pigmentide abil võimeline valgust neelama (van Amerongen *et al.*, 2000). Reaktsioonitsentris muundatakse elektromagnetiline energia keemiliseks energiaks (Emerson ja Arnold, 1932). Reaktsioonitsenter koos teda ümbritsevate valgust neelavate kompleksidega moodustab funktsionaalse fotosünteesilise ühiku (Mauzerall ja Greenbaum, 1989). Üks fotosünteesiline ühik sisaldab ligikaudu 300 bakterklorofüllil ja 200 karotenoidi molekuli (Hu *et al.*, 2002). Üks *Rb. sphaeroides*'e rakk sisaldab sõltuvalt valgusoludest 1,6–6,5 miljonit bakterklorofüllil molekuli (Adams ja Hunter, 2012).

Valgust neelavaid komplekse ehk antenni on kaht tüüpi: valgust neelavad kompleksid I (LH1) ümbritsevad otseselt reaktsioonitsentrit, seevastu valgust neelavad kompleksid II (LH2) asuvad tsentrist kaugemal ning kannavad oma energia üle LH1-le. Iga valgust neelavat kompleksi I ümbritseb sõltuvalt keskkonnatingimustest (temperatuur ja valgusolud kasvu ajal) 2–10 LH2 ringi (vt joonis 1) (Hu *et al.*, 2002; Timpmann *et al.*, 2014).





**Joonis 1. *Rb. sphaeroides*'e fotosünteesilise ühiku mudel (Hu *et al.*, 2002). Reaktsioonitsentrit (RC) ümbritseb ringikujuline LH1 kompleks (tähistatud LH-I), mida omakorda ümbritsevad kaheksa LH2 kompleksi (tähistatud LH-II).**

Kuigi reaktsioonitsentrid on ka ise võimelised footoneid neelama, muudavad fotosünteesilised ühikud valguse kogumise palju efektiivsemaks: antennikompleksid laiendavad neelatava kiirguse spektraalvahemikku, suurendavad valguse neeldumise ristlõikepindala ning võimaldavad efektiivset fotosünteesi laias kiirguse intensiivsusevahemikus (Cogdell *et al.*, 2006).

Ergastusenergia liigub fotosünteesiliste pigmentide vahel kõrgema energiaga molekulidelt madalama energiataseme ehk reaktsioonitsentri suunas. Karotenoidi neeldumismaksimum on nähtava valguse rohelises piirkonnas (~510 nm). LH2 bakterklorofüllide neeldumismaksimumid on lähi-infrapunapiirkonnas 800 ja 850 nm juures. Intaktse LH1 kompleksi bakterklorofüllide neeldumismaksimum on 875 nm juures (siit selle tihti kasutatav tähis B875). Energiaülekanne

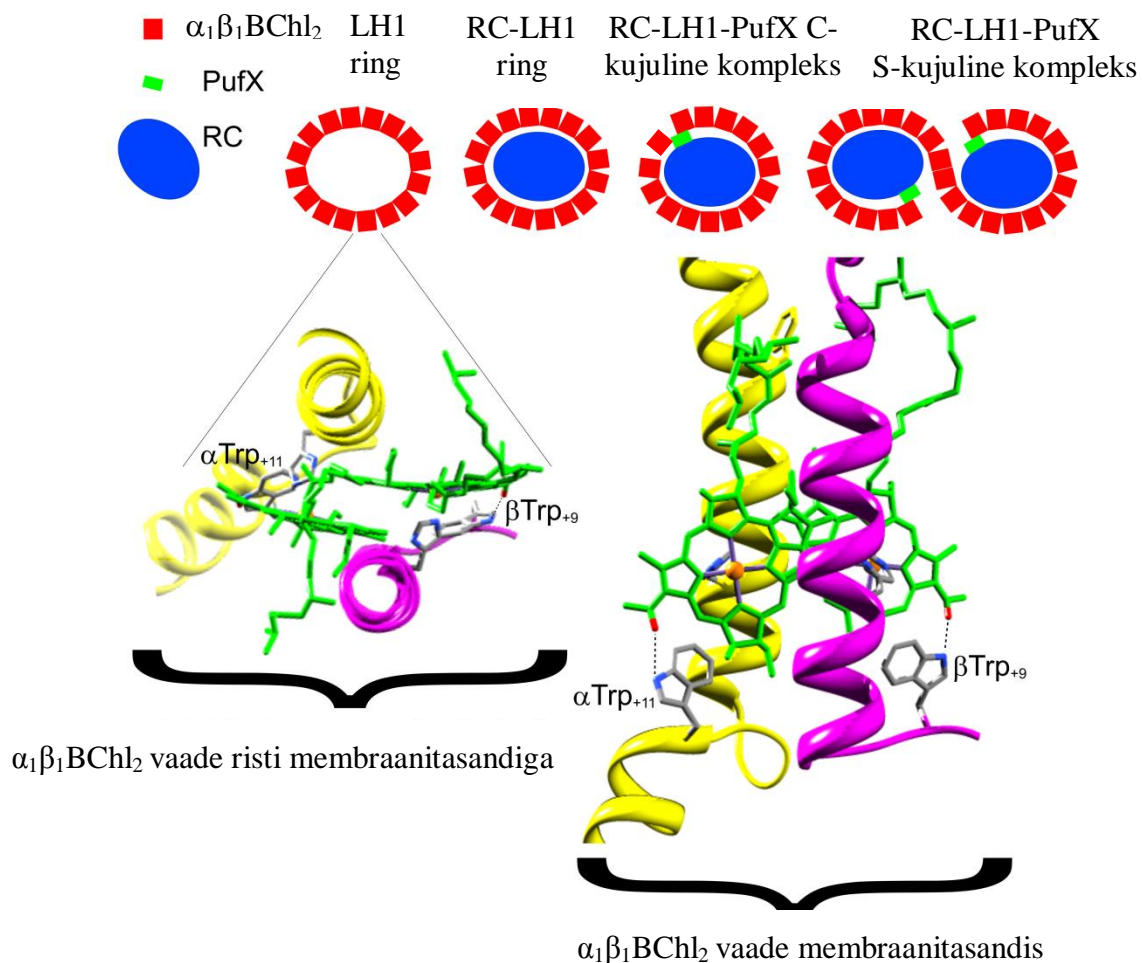
toimub kõrge energiaga karotenoididelt madalama energiaga LH2 ja seejärel LH1 bakterklorofüllide suunas ning lõpuks reaktsioonitsentrisse (van Grondelle *et al.*, 1994). Ergastuse ülekande mehhanismi LH komplekside vahel kirjeldab üldistatud Försteri energiaülekande teooria (Förster, 1965; Sumi, 1999). Ergastusenergia ülekannet valgust neelavate komplekside sees võib käsitleda kui eksitonseisunditevahelist relaksatsiooni (Freiberg ja Trinkunas, 2009; van Amerongen *et al.*, 2000) (vt peatükk 1.1.3). Ergastusenergia ülekanne valgust neelavate komplekside sees ja vahel toimub femto- ja pikosekundite jooksul (Freiberg, 1995; Pullerits ja Sundström, 1996).

Kui ergastusenergia on antennikompleksidest jõudnud reaktsioonitsentri bakterklorofüllideni, käivitub viimaste oksüdatsioon ja selle käigus vabanenud elektronid eemaldatakse fotosünteesilise elektronide transpordiahela kaudu (Hu *et al.*, 2002). Paralleelselt transporditakse vesinikioonid periplasmaatilisse ruumi ja membraanis tekitatakse prootonite gradient. Prootonite gradiendi arvel sünteesitakse adenosiintrifosfaati (ATP), mis on raku universaalne energiaallikas. Nii muundatakse elektromagnetiline energia kokkuvõttes keemiliste sidemete energiaks, mida rakk saab enda elutegevuseks kasutada.

#### 1.1.2 LH1 struktuur

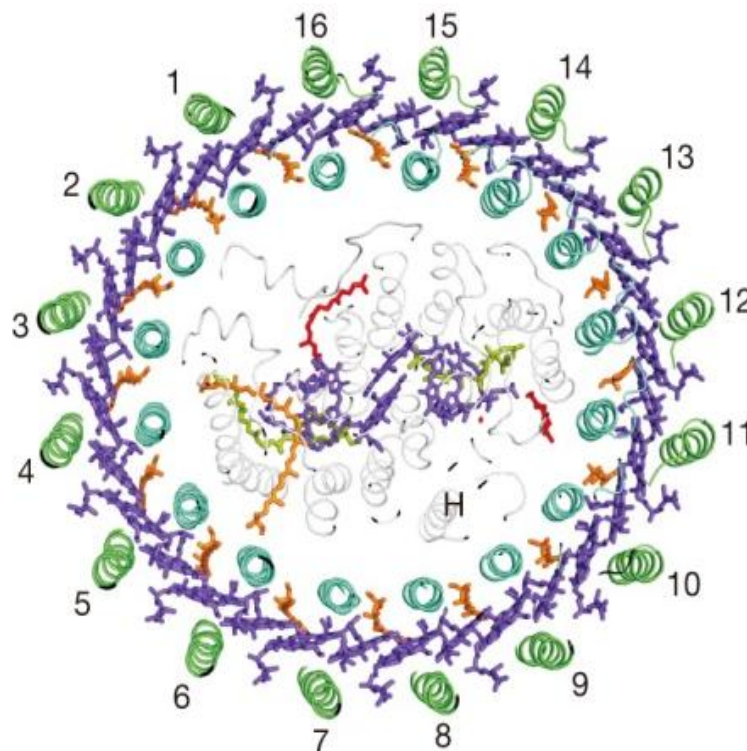
Valgust neelav kompleks I koosneb fotosünteesilistest pigmentidest ja valguahelatest, mis on omavahel mittekovalentselt seotud. *Rb. sphaeroides*'e LH1 valgulise osa moodustavad hüdrofoobsed  $\alpha$ - ja  $\beta$ -apoproteiinid (Zuber, 1985), mis koosnevad vastavalt 58 ja 49 (Kiley *et al.*, 1987) aminohappejäägist ning on mõlemad põhiosas  $\alpha$ -helikaalse sekundaarstruktuuriga (Hu ja Schulten, 1998).

$\alpha$ - ja  $\beta$ -apoproteiinide paarid moodustavad toese nendega mittekovalentselt seotud pigmentidele: iga apoproteiinide heterodimeer seob kaks bakterklorofüllit (Hu ja Schulten, 1998) ja kaks karotenoidi molekuli (Qian *et al.*, 2013). *Rb. sphaeroides*'e heterodimeeri  $\alpha_1\beta_1$ BChl<sub>2</sub> (vt joonis 2) nimetatakse tema neeldumismaksimumi järgi B825-ks (Chang *et al.*, 1990).



Joonis 2. *Rb. sphaeroides*'e LH1 erinevate vormide skemaatilised mudelid (ülal) ja heterodimeeri ülesehitus (all) (Freiberg *et al.*, 2012). Natiivne LH1 (ülal paremalt esimene) on S-kujuline 28 heterodimeerist koosnev transmembraanne kompleks, mille kummaski (pool)silindris on reaktsioonitsenter (RC). LH1 sulgumist täisringideks takistavad PufX valgud. RC-LH1-PufX C-kujuline avatud ring (paremalt teine), mis esineb samuti natiivsetes bakterites, koosneb 15 heterodimeerist. Ringikujulised RC-LH1 (paremalt kolmas) ning LH1 (paremalt neljas) on 16 heterodimeerist koosnevad mutantsed kompleksid. Heterodimeerid (pealtvaates vasakul, külgsuunas paremal) koosnevad omakorda  $\alpha$ - (kollane) ja  $\beta$ - apoproteiinidest (roosa) ning nendega vesiniksidemete kaudu seotud bakteriklorofüll a (BChl) molekulidest (roheline). Vesiniksidemed on apoproteiinide Trp (sinine) ja bakteriklorofüllide 2-atsetüül-karboksüülgruppide hapniku aatomite (punane) vahel.  $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$  vaated on konstrueeritud *Phaeospirillum molischianum*'i LH2 aatomstruktuuri põhjal. Selguse huvides pole siin karotenoide näidatud.

*Rb. sphaeroides*'e natiivsed LH1 struktuurid, mis sisaldavad PufX valku, tehti kindlaks krüoelektron- ja aatomjõumikroskoopia abil (Jungas *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2005). PufX valgud takistavad LH1 sulgumist täisringideks. Natiivne S-kujuline kompleks koosneb 28 heterodimeerist (Qian *et al.*, 2005) (vt joonis 2), mis ümbritsevad kaht reaktsioonitsentrit ja millega on seotud kaks PufX valku ( $\text{RC}_2\alpha_{28}\beta_{28}\text{BChl}_{56}\text{PufX}_2$ ) (Jungas *et al.*, 1999). Käesolevas töös on lisaks  $\text{RC}_2\alpha_{28}\beta_{28}\text{BChl}_{56}\text{PufX}_2$  kompleksile uuritud kõige lihtsama ehitusega ringikujulist mutantset LH1 kompleksi, milles puuduvad nii PufX kui ka RC (vt joonis 2).



**Joonis 3.** *Thermochromatium tepidum*'i RC-LH1 kompleksi 3,0 Å lahutusega röntgenstruktuur (Niwa *et al.*, 2014). LH1 ring koosneb 16  $\alpha$ - ja  $\beta$ -apoproteiini paarist (tähistatud vastavalt sinise ja rohelse värviga) ning nende vahele jäävatest bakteriklorofüllidest (lilla). Karotenoidid on tähistatud oranžiga. LH1 ringi keskel on erinevatest subühikutest koosnev reaktsioonitsenter.

Täisringikujulise LH1 struktuuri illustreerib *Thermochromatium tepidum*'i RC-LH1 kompleksi 3,0 Å lahutusega röntgenstruktuur (vt joonis 3) (Niwa *et al.*, 2014). LH1 on  $\alpha\beta$ -apoproteiinide ja bakteriklorofüllidest ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ) koosnev kergelt elliptilise kujuga heksadekameer ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ).  $\alpha$ -apoproteiinide transmembraansed heeliksid moodustavad seejuures LH1 sisemise ellipsi (telgedega 82 Å ja 73 Å) ja  $\beta$ -apoproteiinid välimise ellipsi (telgedega 105 Å ja

96 Å).  $\alpha\beta$ -apoproteiinide aminoterminused on tsütoplasma poolel ning karboksüterminused on suunatud periplasmasse. Bakterklorofüllü molekuli paiknevad  $\alpha$ - ja  $\beta$ -apoproteiinide vahel. Bakterklorofüllü ja lähima apoproteiini His ning Trp jääkide vahel on vesiniksidemed (H-side). LH1 H-sidemete katkemist kõrge hüdrostaatilise rõhu all on uurinud Freiberg *et al.* (2012).

Kuna H-sidemed on LH1-s vaid heterodimeerisisesed, ei ole heterodimeerid omavahel tugevalt ühendatud. Seetõttu on LH1 ringile (eriti ilma reaktsioonitsentrita) iseloomulik suur struktuurne paindlikkus isegi toatemperatuuril: Bahatyrova *et al.* (2004) on lisaks avatud ja suletud ringikujulistele struktuuridele kirjeldanud ka ruudu-, ellipsi- ja kaarekujulisi LH1 komplekse. Veel leidsid nad, et LH1 ringidel ja ellipsitel on kolm erineva suurusega alavormi, millest levinuim on eespool kirjeldatud heksadekameerne struktuur (vt joonis 3), kuid leidub ka 15 ja 18 heterodimeeriga komplekse.

### 1.1.3 Valgust neelavate komplekside optiline spektroskoopia

Valgust neelavate komplekside uurimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. Käesolevas töös keskendutakse optilisele spektroskoopiale, täpsemalt neeldumis-, fluorestsents- ja tsirkulaarse dikroismi ehk CD-spektroskoopiale, mis võimaldavad uurida makromolekulide struktuurseid ja konformatsioonilisi muutusi.

Elektromagnetilise kiirguse kvandi (footoni) neeldumisel toimuvad molekulides energiatasemetevahelised üleminekud. Elektroonsed üleminekud on tingitud elektronide molekulaarsete orbitaalide muutusest. Üleminek on kõige tõenäolisem kui energiatasemete erinevus langeb kokku pealelangeva valguse energiaga, mis on võrdeline sagedusega. (Spektreid kujutatakse tavapäraselt aga lainepikkuse skaalas, mis on energiaga/sagedusega pöördvõrdeline.)

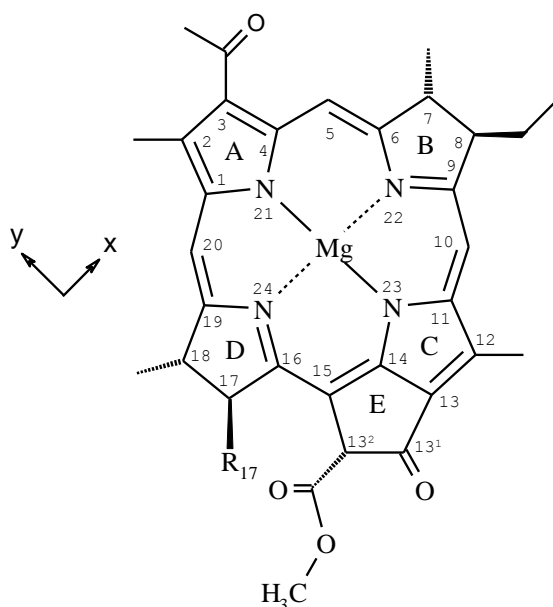
Kõik üleminekud ei ole võrdselt lubatud: ülemineku toimumisele kehtivad optilised keelureeglid. Lubatud on vaid sellised üleminekud, mille käigus toimub laengu nihe (täpsemini, elektroni kirjeldava kvantmehaanilise tiheduse jaotusfunktsiooni nihe). Laengu lineaarne nihe tekitab elektrilise ülemineku dipoolmomendi. Laengu rotatsiooniline nihe aga annab magnetilise dipoolmomendi, mis on tsirkulaarse dikroismi põhjuseks (vt allpool). Ülemineku tõenäosus (intensiivsus) on võrdeline ülemineku dipoolmomendi ruuduga. Ülemineku dipoolmomendil on kindel suund ning ainult see komponent pealelangevast kiirgusest, mille elektrivälja vektor (E-vektor) on dipoolmomendiga samasuunaline, tekitab molekulis energiatasemetevahelisi üleminekuid. Praktikas ei ole keelureeglid alati ranged, kuna reaalsel makromolekulidel on



palju täiendavaid interaktsioone, mistõttu ilmnevad mõõdetavates spektrites ka „keelatud“ üleminekud.

Määramatuse printsiibist tulenevalt ei ole piiratud elueaga ergastatud oleku energiataset võimalik täpselt määrata; seetõttu on energia laiali jaotunud ja lõpmata kitsaste neeldumisjoonte asemel on lõpliku laiusega neeldumisribad. Neeldumine on kvantiseeritav. See tähendab, et proovi summaarne neeldumine sõltub molekulide arvust, milles üleminek toimub. Seega vastab summaarne neeldumine (neeldumisspektrialune pindala) proovi kontsentratsioonile.

Bakterklorofüll (vt joonis 4) neeldumisspekter tuleneb tsüklilise tetrapürrooli energiaüleminekutest. Tetrapürroolringi tasandis olevad x- ja y- telg tähistavad ülemineku dipoolmomentide suundasid  $Q_y$  ja  $Q_x$  ning  $B_x$  ja  $B_y$  üleminekute jaoks (tähistused on toodud üleminekuenergia kasvu järjekorras). Üksiku bakterklorofüll  $Q_y$  neeldumisriba ilmneb orgaanilises solvendis 780 nm piirkonnas.



**Joonis 4. Bakterklorofüll a (Freibergi ja Garabi avaldamata materjal). x- ja y-telg tähistavad ülemineku dipoolide suundasid tsüklilise tetrapürrooli tasandis.**

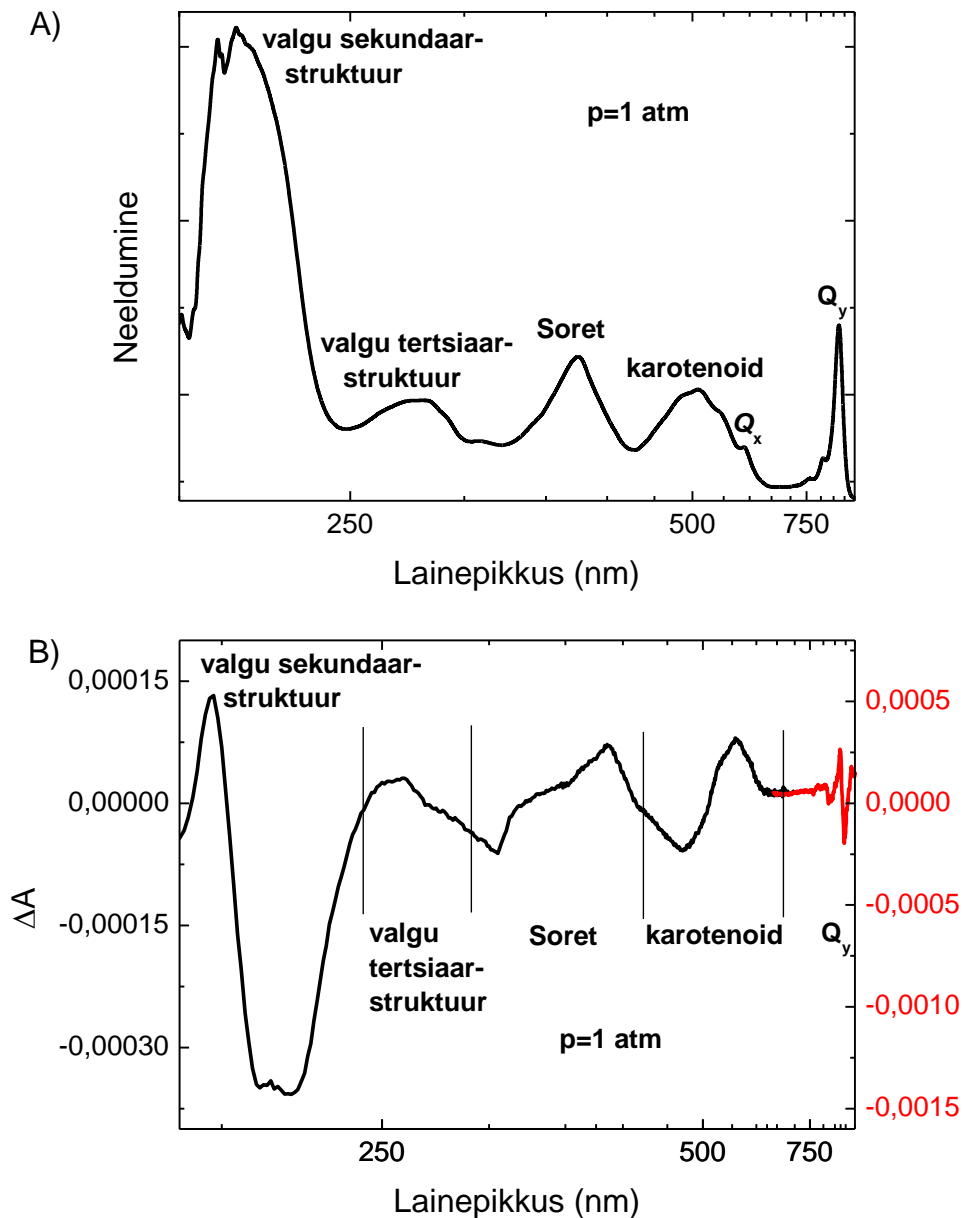
Lähestikku paiknevate bakterklorofüllide ülemineku dipoolmomentid interakteeruvad omavahel. Kui üks bakterklorofüll neelab footoni ja ergastub, võib ergastusenergia kanduda edasi ühelt molekulilt teisele. Säärast liikuvat ergastust tuntakse eksitonina. Eksitoni edasikandumisel liigub

energia ilma summaarse laengu ülekandeta. Eksitoninteraktsioonid põhjustavad neeldumisribade laienemist, lõhenemist ja nihkumist.

Ergastusenergia ülekanne fotosünteesiliste valgust neelavate komplekside pigmentide vahel on reeglina eksitonpäritolu (van Amerongen *et al.*, 2000). Valgust neelavas kompleksis mõjutab bakterklorofüllide eksitonüleminekuid ka ümbritsev valgu ja lahuse keskkond (Freiberg ja Trinkunas, 2009).

*Rb. sphaeroides*'e natiivse S-kujulise RC-LH1-PufX kompleksi neeldumisspekter ultravioletist lähi-infrapunapiirkonnani koos erinevate ribade tähistusega on toodud joonisel 5A (Freiberg *et al.*, 2012). Molekulaarse  $Q_y$  üleminekuga seotud B875 eksitonriba LH1 ringis on, võrreldes vaba bakterklorofüllide  $Q_y$  üleminekuenergiaga, nihkunud peaaegu 100 nm punasemasse spektri ossa.  $Q_x$  üleminekuga seotud eksitonriba neelab 590 nm piirkonnas. LH1-s moodustavad bakterklorofüllid  $B_x$  ja  $B_y$  üleminekud Soret' neeldumisriba, mille maksimum asub 375 nm juures. Valgust neelavasse kompleksi kuuluvate karotenoidide neeldumisriba 510 nm piirkonnas on lai. LH1 valgulise osa tertsiaar- ja sekundaarstruktuuri iseloomustavad neeldumisribad paiknevad ultravioletapiirkonnas, 300 nm lühematel lainepikkustel. Sekundaarstruktuuris on levinumaks kromofooriks (ehk molekuli kiirgust neelavaks osaks) valgu peptiidside, tertsiaarstruktuuris aga disulfiidside. Ka aromaatsed aminohapped neelavad 300 nm piirkonnas.

Seega domineerib nähtava valguse ja lähi-infrapunapiirkonnas LH1 fotosünteesiliste pigmentide neeldumine ning ultravioletapiirkonnas LH1 valgulise osa neeldumine. See võimaldab LH1 dissotsiatsiooni uurida paralleelselt nii pigmentide kui valgu spektris toimunud muutuste kaudu.



Joonis 5. A) *Rb. sphaeroides*'e isoleeritud LH1-RC-PufX S-kujulise kompleksi (3 mM DHPC) neeldumisspekter normaalarõhul ja toatemperatuuril (Freiberg *et al.*, 2012). Joonisel on tähistatud  $Q_y$  (B875),  $Q_x$ , karotenoidi, Soret' ja valgu tertsiaar- ning sekundaarstruktuuride neeldumisribad. B) *Rb. sphaeroides*'e isoleeritud ringikujulise LH1 CD-spekter (3 mM DHPC) normaalarõhul 29 °C juures. Nähtava ja ultraviolettpiirkonna (must) ning infrapunapiirkonna CD-ribade (punane) intensiivsuse suure erinevuse tõttu on joonisel kasutatud erinevaid skaalasid.



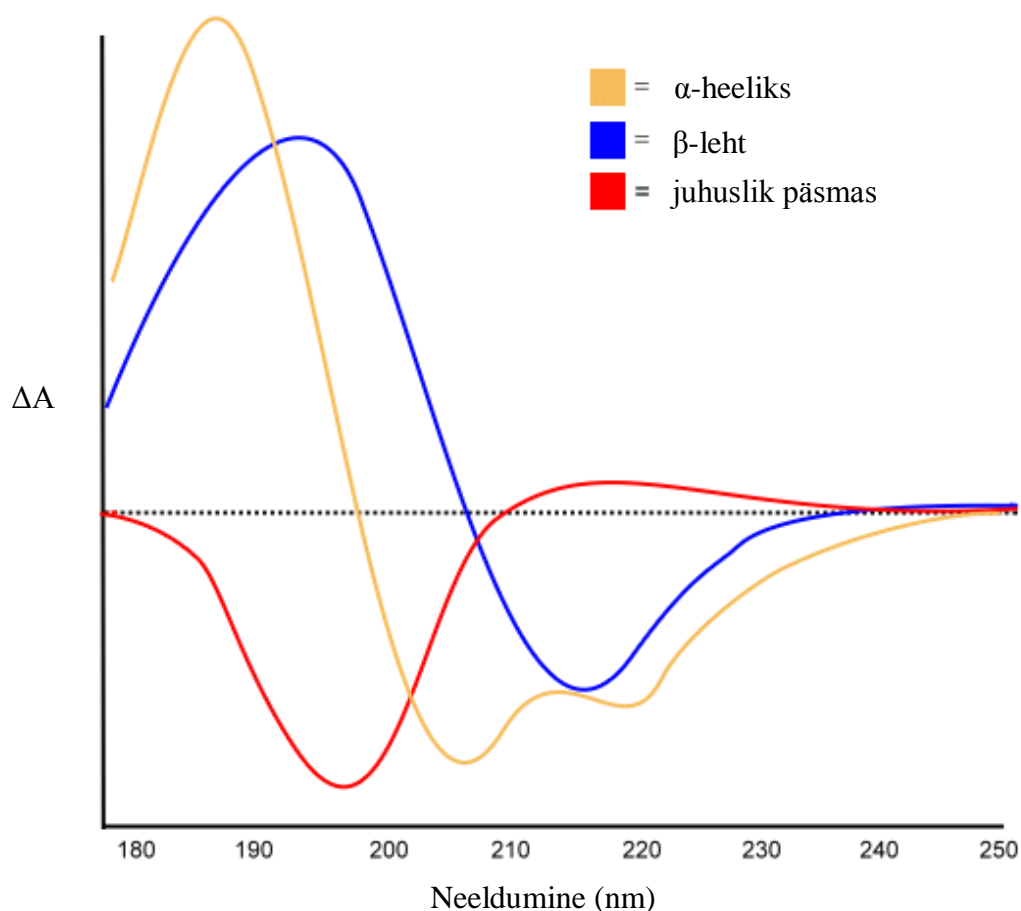
Bakterklorofülle on võimalik laseriga ergastada kõrgemale energiatasemele, misjärel toimub relaksatsioon tagasi madalamale energiatasemele. Relaksatsiooni käigus bakterklorofüllid kiirgavad ehk fluorestseeruvad. Kiirgav valgus on reeglina pikema lainepikkusega (väiksema energiaga) kui valgus, mida molekulid neelasid, sest igal elektroonsel energiatasemel võib elektron-võnkeinteraktsiooni tõttu omakorda olla erinevaid vibratsioonitasemeid. Molekul ergastub kõrgema elektroonse energiataseme kõrgemale vibratsioonitasemele ning relaxeerub kiiresti sama elektroonse energiataseme kõige madalamale vibratsioonitasemele. Seejärel naaseb bakterklorofüll põhiolekusse, kiirates footoni. Kiirgus- ja neeldumisspektri sama ülemineku maksimumide lainepikkuste vahet tuntakse Stokes'i nihkena. Kiirgus- ja neeldumisspektrites kehtivad energiatasemete üleminekute kohta samad optilised keelureeglid. Kiirgusspektrite abil on võimalik saada täiendavat infot võrreldes neeldumisspektritega, kuna kiirgusspektri ribade intensiivsus korreleerub neelatud footonite arvuga ja fluorestsentsi kvantsaagisega konkreetsel lainepikkusel. Valgust neelavate komplekside kiirgusspekter sõltub samuti pigmentidevahelistest eksitoninteraktsioonidest.

Kiraalse konformatsiooniga ehk optiliselt aktiivsetes molekulides toimub nii lineaarne kui rotatsiooniline laengunihe, mille tulemusel tekib helikaalne, optiliselt aktiivne üleminek. Kuna valguse neeldumine sõltub molekuli ülemineku dipoolmomendi ja valguse E-vektori suunast, neelavad kiraalse konformatsiooniga molekulid parema- ja vasakukäeliselt ringpolariseeritud\* valgust erineval määral. Neeldumise vahet ( $\Delta A$ ) tuntakse tsirkulaarse dikroismina (CD). CD-spektris tekivad interakteeruvate dipoolide tõttu sümmeetrilised positiivse ja negatiivse komponendiga kaksikribad. CD-spektromeetria üks levinumaid rakendusi on valkude optilise aktiivsuse mõõtmine, et määrata nende sekundaarstruktuuri. Valgu sekundaarstruktuuri elementide ( $\alpha$ -heeliks,  $\beta$ -leht ning juhuslik päsma) tüüpilised CD-spektri signatuurid on kujutatud joonisel 6 (Greenfield ja Fasman, 1969).

LH1 CD-spektris (vt joonis 5B) on sümmeetrilised positiivse ja negatiivse komponendiga kaksikribad, mis viitab vastavate ribade eksitonpäritolule (Campbell ja Dwek, 1984). Seega ei interakteeru LH1-s eksitoonselt mitte ainult bakterklorofüllid, vaid ka karotenoidid ja valgu kromofoorid.

---

\* Polariseerimata valguses võib E-vektor võnkuda mistahes suunas, mis on risti valguse leviku suunaga. Tsirkulaarselt polariseeritud valgust võib vaadelda kui kahe ristuva võrdse amplituudiga E-vektori summat, kui nende vektorite vahel on  $90^\circ$  faasinihe. Seega on summaarse E-vektori teekond ringpolariseeritud valguses kas parema- või vasakukäelise heeliksi kujuline.



**Joonis 6. Valgu sekundaarstruktuuri elementide tüüpilised CD-spektrid Greenfieldi ja Fasmani (1969) järgi. Allikas: <http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>.**

## 1.2 Kõrge rõhu tähtsus bioloogias

Bioloogias peetakse tavaliselt kõrgeks rõhku, mis ületab atmosfäärirõhku 100 või enam korda. Maal domineerivad kõrgrõhu-ökosüsteemid: üle 10 MPa rõhu all on 62% biosfäärist (Prieur ja Marteinsson, 1998), toodetakse 50% primaarsest biomassi produktsioonist ning elab kuni 70% kõigist rakkudest (Oger ja Jebbar, 2010). Kõrgrõhu-ökosüsteemide uurimine algas umbes 65 aastat tagasi piesofiilsete mikroobide kasvatamisega labori tingimustes (Johnson ja Zobell, 1949). Rõhk mõjutab pea kõiki raku talitluse aspekte: metabolismi, geeniekspressiooni, replikatsiooni, rakujagunemist, valgusünteesi, ensüümide aktiivsust ning membraanide voolavust (Bartlett, 2002).

1977. aastal avastati hüdrotermaalsed lõõrid ja neid ümbritsev elurikkus (Ballard, 1977). Nn mustade suitsetajate keskkonnatingimuste ja organismide lähem uurimine näitas, et need kooslused võivad eksisteerida sõltumatult päikesevalgusest, fotosünteesist ja hapnikust kui elektronide lõppaktseptorist (Erauso *et al.*, 1993). Trevorsi (2002) hüpoteesi kohaselt tekkiski elu Maal proto-ookeani põhjas hüdrotermaalsetes lõõrides madala kiirgusdoosi, kõrge hüdrostaatilise rõhu ja stabiilse temperatuuri tingimustes. Hüpoteesi toetab hüpertermofiilsete ja piesofiilsete organismide lai levik kõige algelisemate bakterite ja arhede hulgas, mille põhjal oletatakse, et kõigi elusorganismide viimane ühine eellane LUCA oli piesofiil (Daniel *et al.*, 2006).

Elu eksisteerimine kõrge rõhu all toetab panspermia hüpoteesi (Hoyle ja Wickramasinghe, 1981). Kõrge rõhu mõju uurimine rakkudele ja biomolekulidele on oluline astrobioloogias, et vastata küsimusele, kas elusorganisme võib leida päikesesüsteemi teistel planeetidel ja nende kaaslastel kõrge rõhuga keskkondades (Jakosky ja Shock, 1998).

Kõrge hüdrostaatilise rõhu rakendamine võimaldab uurida bioloogiliste süsteemide struktuurseid muutusi. Seejuures on kõrgel rõhul olulisi eeliseid võrreldes temperatuuri muutmisega samades süsteemides. Rõhk võimaldab lahutada soojuse (või temperatuuri) ja ruumala muutuste poolt põhjustatud efektid, mis jääksid kõrget temperatuuri kasutades omavahel eristamatuks (Silva ja Weber, 1993).

Bioloogiliste objektide uurimiseks kasutatakse tavaliselt rõhkusid normaalrõhust kuni 1 GPa-ni. Sääraste rõhkude juures muutuvad ja katkevad molekulidevahelised mittekovalentsed sidemed pöördvalt, võimaldades uurida valkude sekundaar-, tertsiaar- ja kvaternaarstruktuuri olukorras, kus kovalentsete sidemetega määratud primaarstruktuur säilib (Winter ja Dzwolak, 2005). Seega on rõhul erinevalt temperatuurist või keemilistest ühenditest (nt urea) nõrk ning pöörduv denatureeriv toime. Kõrget rõhku võib ühildada madalate temperatuuridega, et uurida valkude denatureerumist külma tingimustes (Daniel *et al.*, 2006). Samuti saab kõrge rõhu abil uurida lipiidide faasisiirdeid, mis on seotud membraani voolavuse muutustega, või avastada uusi faase ja protsesse (Winter ja Dzwolak, 2005).

Kõrge hüdrostaatilise rõhu üks olulisemaid rakendusi on toiduainete pastöriseerimine ja steriliseerimine, mis võimaldab säilitada toiduaine maitset, värvust, tekstuuri ning vitamiinisaldust paremini kui kuumtöötlus (Swientek, 1992).

Kõrge rõhk võib muuta valkude agregeerumise pöörduvaks ning võimaldab seeläbi uurida Alzheimeri, Huntingtoni ja Parkinsoni tõbe ning prioonhaigusi, et astuda samm nendele haigustele ravi leidmise suunas (Randolph *et al.*, 2002). Agregeerumine vähendab ka valgulist päritolu ravimite (nt inimese kasvuhormooni) toimet, kõlblikkusperioodi ja ohutust. Kõrge rõhuga töötlemine võib selle probleemi lahendada (St. John *et al.*, 1999).

Uurides keemiliste reaktsioonide sõltuvust rõhust, on võimalik leida aktivatsiooni- ja reaktsiooniruumalad, mis annavad olulist teavet reaktsiooni tasakaalu ja mehhanismi kohta (Winter ja Dzwolak, 2005). Le Châtelier' printsiibi kohaselt nihkub reaktsiooni tasakaal rõhu suurenedes selle oleku suunas, mille ruumala on väiksem, ning kiireneb see reaktsioon, mille üleminekuoleku ruumala on väiksem kui lähteolekul. Valkude suhteline ruumalamuutus rõhu all on tavaliselt 1–3% kbar kohta (Kharakoz, 2000). LH2 kokkusurutavus on 2% kbar kohta (Timpmann *et al.*, 2001).

### **1.3 Detergendi mõju integraalsele membraanivalgule**

Bilipiidne rakumembraan on väga heterogeenne, kompleksne ja dünaamiline süsteem, mille erinevad komponendid mõjutavad üksteist ja on mõjutatud temperatuuri, rõhu, pH jt keskkonnatingimuste poolt (Seddon *et al.*, 2004). Seetõttu isoleeritakse membraanivalgud tihti kas detergendi või kunstlike membraanide ehk liposoomide keskkonda, et vähendada uuritava süsteemi keerukust (Hauser, 2000).

Detergendid on amfipaatsed ühendid polaarse pea ja hüdrofoobse rasvhappejääkidest koosneva sabaga (Seddon *et al.*, 2004). Detergent võimaldab integraalsel membraanivalgul vees lahustuda: detergendi hüdrofoobne osa katab valgu ja hüdrofiilne pea on interaktsioonis vee molekulidega. Kui detergendi kontsentratsioon vesilahuses ületab kriitilise piiri, moodustuvad mõnest kuni mitmesajast molekulist koosnevad kerakujulised mitsellid (Privé, 2007). Mitselli kuju ja membraanivalgu paigutus mitsellis sõltub konkreetsest detergendist ja valgust (Roth *et al.*, 1991). Vaatamata oma näilisele lihtsusele on detergentide kasutamine membraanivalkude lahustamiseks tehniliselt keeruline (le Maire *et al.*, 2000) ning detergendi ja valgu interaktsioonid mitmetahulised (Garavito ja Ferguson-Miller, 2001).

Detergendi rasvhappejääkide ahelates võivad rõhu või temperatuuri muutudes esineda faasisiirded (Kaneshina *et al.*, 2003; Matsuki *et al.*, 2003). Rõhu kasv põhjustab ülemineku vedelkristall-olekust, kus rasvhappejäägid on korrapäratus konformatsioonis, geelolekusse, kus

rasvhappejäägid paiknevad korrapäraselt ja väljasirutunult (Daniel *et al.*, 2006). Rasvhappejääkide rõhu-temperatuuri faasidiagramm võib olla väga keeruline ja sisaldada kuni kuut siiret (Winter ja Dzwolak, 2005). Detergendi faasisiirdeid mõjutab ka selle kontsentratsioon ja interaktsioon membraanivalkudega (Garavito ja Ferguson-Miller, 2001).

Kuigi detergentid on esimeses lähenduses membraanidega sarnased, ei ole nende mõju integraalsetele valkudele ühesugune. Näiteks on membraansetes LH1 kompleksides apoproteiinide ja bakteriklorofüllil vahelised vesiniksidemed rõhu suhtes vähem tundlikud kui detergentis lahustatud LH1-s (Freiberg *et al.*, 2012).

Integraalsed membraanivalgud moodustavad 20–30% nii eukarüootsete kui prokarüootsete organismide proteiinidest (Wallin ja Heijne, 1998). Membraanide keerukuse ning detergentide ja liposoomide kasutamisega seotud probleemide tõttu on membraanivalke aga väga vähe uuritud. Proteiini andmepangas (RCSB Protein Data Bank) moodustavad membraanivalgud alla 3% kõigist teadaoleva struktuuriga valkudest.

#### **1.4 Oligomeersete valkude dissotsiatsioon**

Oligomeersete vesilahustuvate valkude dissotsiatsiooni on uuritud üle 50 aasta. Müosiini dissotsiatsioon aktomüosiinist toimub ATP või naatriumpürofosfaadi toimel (Connell, 1958). Oktameerse hemerütriini dissotsiatsiooni sulfhüdruülrupi seondumise tõttu on uurinud Klapper ja Klotz (1968) ja dissotsiatsiooni sõltuvust temperatuurist Langerman ja Klotz (1969). Soja valgud dissotsieeruvad ja seejärel agregeeruvad temperatuuri tõstmise tõttu (German *et al.*, 1982).

Oligomeersete vesilahustuvate valkude dissotsiatsioon võib toimuda ka kõrge rõhu toimel. Glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas dissotsieerub täielikult 200 MPa juures, kusjuures dissotsiatsioon on pöörduv (Schmid *et al.*, 1975). Tšaperon cpn60 koosneb 14 subühikust ja dissotsieerub 50% ulatuses 175 MPa juures (Gorovits *et al.*, 1995). Oligomeersed tsütoplasmaatilised proteiinid dissotsieeruvadki tavaliselt rõhkudel, mis jäävad alla 300 MPa (Silva ja Weber, 1993).

Dimeerse vesilahustuva Arc repressori dissotsieerumisel rõhu toimel tekivad monomeerid, mis erinevad oma konformatsioonilt keemiliste denaturantide või temperatuuri poolt tekitatud monomeeridest (Silva *et al.*, 1992). Seega mõjutab rõhk oligomeeri dissotsiatsioonil vabanevate subühikute konformatsiooni.

Vesikeskkonnas mõjutavad oligomeersete valkude dissotsiatsiooni ennekõike polaarsed veemolekulid, mis pääsevad valgu tühimikesse, moodustavad vesiniksidemeid ning tekitavad hüdratsioonikihi (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002). Vesilahustuvate valkude dissotsiatsiooni tulemused pole üldistatavad integraalsetele membraanivalkudele, mille otsekontakt veega on väga piiratud.

Membraanivalkude dissotsiatsiooni on seni uuritud valdavalt keemiliste reagentide või kõrge temperatuuri abil. Maksa asialoglükoproteiine seondav oligomeerne membraanivalk dissotsieerub denaturantide toimel subühikuteks (Kawasaki ja Ashwell, 1976). Spektriin on membraanivalk, mis on madala temperatuuri juures (0 °C) tetrameerne, kuid temperatuuri tõstmisel 37 °C-ni dissotsieerub dimeerideks (Ralston *et al.*, 1977).

Purpurbakteri *Rhodospirillum (Rs.) rubrum*'i LH1 ring ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{28}$ ) võib detergendi toimel normaalarõhul dissotsieeruda heterodimeerseteks ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ) subühikuteks B820 (Loach *et al.*, 1985). *Rb. sphaeroides*'e LH1 dissotsiatsiooni heterodimeerideks detergendi toimel demonstreerisid Chang *et al.* (1990). Wang *et al.* (2003) leidsid, et *Rs. rubrum*'i  $\beta_2\text{BChl}_2$  homodimeeride neeldumismaksimum on samal lainepikkusel kui heterodimeeril  $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ , kuid  $\alpha$ -apoproteiinide olemasolul on heterodimeeri teke tugevalt eelistatud. Seetõttu võib  $\beta_2\text{BChl}_2$  hulka pidada tühiseks, võrreldes heterodimeeri kogusega.  $\alpha$ -apoproteiinid homodimeere ei moodusta.

Heterodimeerid võivad detergendi kontsentratsiooni edasisel tõstmisel omakorda dissotsieeruda monomeerideks, mis neelavad 777 nm piirkonnas ja mille spektroskoopiline tähis on seetõttu B777 (Parkes-Loach *et al.*, 1987). Kuna LH1 monomeersete subühikute fluorestsentsi saagis oli üle kahe korra väiksem kui vabal bakteriklorofüllil, järeldati, et B777 näol on tegemist BChl ja apoproteiini kompleksiga. Hilisemad tööd (Arluisson *et al.*, 2002) on kinnitanud, et monomeeris on bakteriklorofüll seotud kas  $\alpha$ - või  $\beta$ -apoproteiiniga ( $\alpha_1\text{BChl}_1$  või  $\beta_1\text{BChl}_1$ ). *Rs. rubrum*'i LH1 dissotsiatsiooni heterodimeerideks B820 võib normaalarõhul esile kutsuda ka temperatuuri tõstmisega (Pandit *et al.*, 2001). Temperatuuri mõju *Rb. sphaeroides*'e LH1 stabiilsusele pole käesoleva töö autorile teadaolevalt seni uuritud.

Membraanivalkude dissotsiatsiooni rõhu all on vähe uuritud. Penniston (1971) püstitas hüpoteesi, et ATP-aaside rõhust sõltuva deaktiveerumise põhjuseks on subühikute dissotsiatsioon. Kato *et al.* (2002) hüpoteesi kohaselt dissotsieerub neljast protomeerist koosnev  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas 100–

220 MPa juures subühikuteks. Kloroplasti ATP-süntaasi dissotsiatsioon toimub 80–200 MPa juures (Souza *et al.*, 2004). Linke *et al.* (2008) leidsid, et *Vibrio cholerae* dimeerne virulentsusregulaator ToxR dissotsieerub *in vivo* 20–50 MPa juures. Homoloogiline valk reguleerib süvaveebakteris *Photobacterium profundum* rõhust sõltuvat geeniekspressiooni (Welch ja Bartlett, 1998). Nii LH1 (Freiberg *et al.*, 2012) kui LH2 (Braun *et al.*, 2005; Gall *et al.*, 2003; Kangur *et al.*, 2008a; Kangur *et al.*, 2008b; Tars *et al.*, 1994; Timpmann *et al.*, 2001) on uuritud kuni 2,1 GPa rõhu all, kuid valgust neelavate komplekside dissotsiatsiooni kirjeldatud ei ole.

## 2 Töö eesmärgid ja lähenemisviis

Käesoleva magistritöö esmaseks eesmärgiks on jätkata autori bakalaureusetöös (Puusepp, 2013) alustatud kõrge rõhu uuringuid leidmaks tingimused, mille juures *Rhodobacter sphaeroides*'e oligomeerne valgust neelav kompleks LH1 ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ) dissotsieerub erinevateks subühikuteks. Teiseks soovib autor näidata, et dissotsiatsioon võib toimuda mitmes astmes ning dissotsieerunud subühikud võivad taas assotsieeruda. Kolmandaks eesmärgiks on näidata, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust. Neljandaks soovib autor leida parameetrid, mis võimaldaksid kirjeldada dissotsiatsiooni keemilist kineetikat.

Eesmärkide täitmiseks kasutab autor optilise spektroskoopia meetodeid (neeldumis-, kiirgus- ja CD-spektroskoopia), kuna need võimaldavad uurida LH1 dissotsiatsiooni käigus toimuvaid struktuurseid muutusi nii fotosünteesiliste pigmentide (bakterklorofüll ja karotenoidid) kui LH1 valgulises osas. Kõige üldisemalt vastab LH1 kompleksi dissotsiatsioonile pigmendi spektrite sininihe ja optilise aktiivsuse vähenemine, mis on kooskõlas nende spektrite eksitonolemusega.



### 3 Materjalid ja meetodid

#### 3.1 Katseobjektid

Käesoleva töö peamiseks uurimisobjektiks on *Rb. sphaeroides*'e isoleeritud ringikujuline valgust neelav kompleks LH1 ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ). Valgust neelava kompleksi eraldas rakumembraanist, puhastas ning andis uurimiseks C. Neil Hunteri töörühm Sheffieldi Ülikoolist. LH1 eraldati *Rb. sphaeroides*'e DD13/G1 tüvest, mida oli plasmiidse kandja vahendusel täiendatud *puf* fragmendiga (Jones *et al.*, 1992). Kompleksi puhastamiseks kasutati Frenchi pressi ja sahharoosi gradiendis tsentrifuugimist. Proov isoleeriti 10 mM Tris-HCl, 1 mM etüleendiamiintetraatsetaadi (EDTA), 3 mM 1,2-diheptanoül-*sn*-glütsero-3-fosfokoliini (DHPC) (pH=7,9) puhverlahusesse. Kõrge rõhu katsete jaoks on Tris väga sobiv puhver, kuna selle pH rõhu toimel praktiliselt ei muutu (Neuman *et al.*, 1973). Proovi optiline tihedus 875 nm juures on 7,2 cm kohta.

Võrdluseks kasutatud natiivse isoleeritud RC-LH1-PufX S-kujulise kompleksi ( $\text{RC}_2\alpha_{28}\beta_{28}\text{BChl}_{56}\text{PufX}_2$ ) eraldas *Rb. sphaeroides*'e DBC $\Omega$  tüvest ja puhastas samuti C. Neil Hunteri uurimisrühm Sheffieldi Ülikoolis (Jones *et al.*, 1992). S-kujuline natiivne kompleks on isoleeritud 20 mM 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhappe (HEPES); 0,03% *n*-dodetsüül- $\beta$ -D-maltosiidi (DDM) (pH=7,8) puhvrisesse. RC-LH1-PufX kompleksi optiline tihedus 875 nm juures on 70 cm kohta. Mõlemat proovi säilitatakse -78 °C juures.

Dissotsiatsiooni uurimiseks lisati nii LH1 kui RC-LH1-PufX proovile täiendav hulk detergenti DHPC. Kuna LH1 dissotsiatsioon on päevi kestav protsess, lähtuti detergenti kontsentratsiooni valikul vajadusest reaktsiooni võimalikult palju kiirendada, jälgides samal ajal, et proov ei muutuks liialt ebastabiilseks. Kõrge rõhu katsetes kasutati 13 mM DHPC kontsentratsiooniga proove, kui ei ole märgitud teisiti. See kontsentratsioon on oluliselt kõrgem kui kriitiline mitselli moodustamiseks vajalik kontsentratsioon normaaltingimustel (1,4–1,8 mM) (Hauser, 2000). Kõrge detergenti kontsentratsioon aitab seega kindlustada LH1 lahustumist detergendis. Võrdluseks uuriti ka 3 mM detergenti kontsentratsiooniga LH1 (ehk standardproovi) stabiilsust kõrge rõhu all.

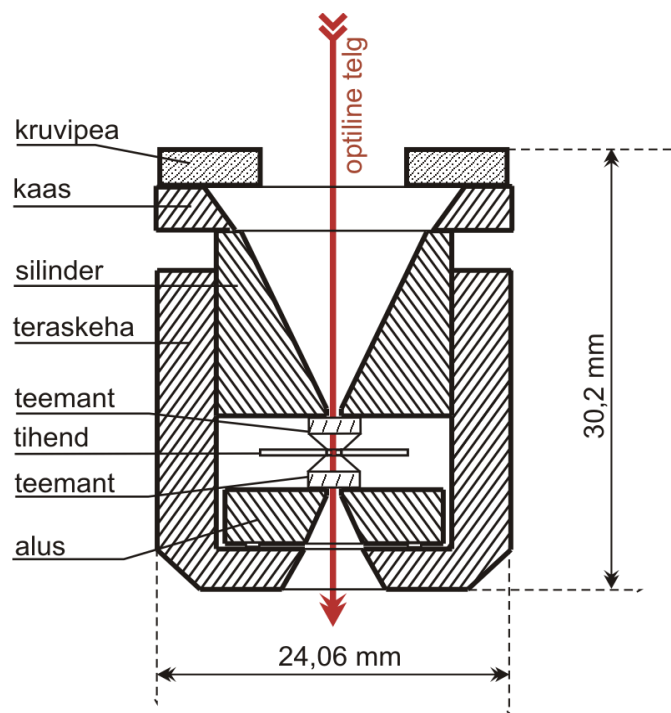
Natiivse RC-LH1-PufX ( $\text{RC}_2\alpha_{28}\beta_{28}\text{BChl}_{56}\text{PufX}_2$ ) kompleksi dissotsiatsiooni uurimiseks rõhu all lahjendati proovi 10 korda ning lisati proovile DHPC-d 13 või 22 mM kontsentratsioonis. Reaktsioonitsentri mõju arvestamata on 22 mM DHPC-ga proovis heterodimeersete subühikute ja detergendi suhe sama, mis ringikujulises LH1 kompleksis ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ).

Normaalrõhul toimunud CD-spektromeetria katsete tarvis kasutati 3; 5; 10; 15; 20; 40; 60; 80; 100; 150 ning 200 mM DHPC-ga LH1 proove.

### 3.2 Teemantalasi-rõhurakk

Kõrge rõhu tekitamiseks kasutati teemantalasi-rõhurakku (vt joonis 7) (D-02, Diacell Products Ltd). Terasest valmistatud rõhurakk koosneb silindrist, seda ümbritsevast kehast ja kaht osa kokku suruvast kaanest, mis kinnitatakse kruvide abil. Silindril ja kehal on keskel avad, mida katavad tasaparalleelsed teemandid. Teemanteid eraldab teineteisest metalltihend, mille keskel on 300  $\mu\text{m}$  läbimõõduga ava. Metalltihendi paksus on 400  $\mu\text{m}$ . Proov sisestatakse tihendi avasse. Rõhurakus oleva proovi ruumala on seega alla 0,03  $\mu\text{L}$ . Teemantalasi-rõhurakus tekitatakse hüdrostaatiline rõhk kruvide pingutamise abil. Teemantalasi-rõhuraku puhastamine ja kokkupanemine toimus mikroskoobi (S MBS-2) all suurendusega  $12,5 \times 7$ .

Hüdrostaatilise rõhu detekteerimiseks kasutati sensorina mikroskoopilisi sfäärilisi rubiinikristalle (RSA Le Rubis SA) diameetriga kuni 30  $\mu\text{m}$ . Rõhurakk oli LH1 dissotsiatsiooni kiirendamiseks termostateeritud (termostaat Haake Q/F3 80047) 29 °C ( $\pm 0,1$  °C) peale, kui ei ole märgitud teisiti. Temperatuuri valikul tehti kompromiss proovi stabiilsuse ja reaktsiooni kiiruse vahel.



**Joonis 7. Teemantalasi-rõhurakk ristlõikes. Rakk on valmistatud roostevabast terasest ning koosneb silindrist, seda ümbritsevast kehast ja kruvide abil kinnitatavast kaanest. Proov sisestatakse teemantide vahel paikneva metalltihendi avasse ning surutakse kruvide pingutamisel kokku. Punase noolega on tähistatud proovi läbiva valguskiire tee. Liina Kanguri joonist (Kangur, 2013) on autori loal mugandanud ja täiendanud Hain Salujärv ja Marit Puusepp.**

### 3.3 Optilised mõõtesüsteemid

Kõrge rõhu katseteks kasutati kolme ühendatud optilist süsteemi, mida kirjeldab skeem joonisel 8. Esimene süsteem on vajalik rõhu registreerimiseks ning teine proovi neeldumisspektri mõõtmiseks. Kolmas optiline süsteem on vajalik LH1 kiirgusspektri registreerimiseks. Optiliste süsteemide kalibreerimiseks kasutati Ne-lampi, mille gaas sisaldab vähesel hulgal argooni.

Rõhu mõõtmiseks ergastati mikroskoopilised rubiinikristallid Nd:YAG laseriga lainepikkusega 532 nm. Rubiinide kiirgusspektri registreeris 1,5 m fookuskaugusega Jobin-Yvon TH150 spektrograaf ja sellega ühendatud termoelektriliselt jahutatud laengsidestusseadis- ehk CCD-kaamera (EEV30-11, Andor Technology). Spektrograaf kalibreeriti iga mõõtmise jaoks eraldi.

LH1 ja RC-LH1-PufX neeldumis- ja kiirgusspektrite mõõtmiseks kasutati 0,3 m fookuskaugusega Shamrock SR-303i spektrograafi (Andor Technology), mis oli ühendatud termoelektriliselt jahutatud CCD-kaameraga iDUS DV420A-OE (Andor Technology). Lähi-

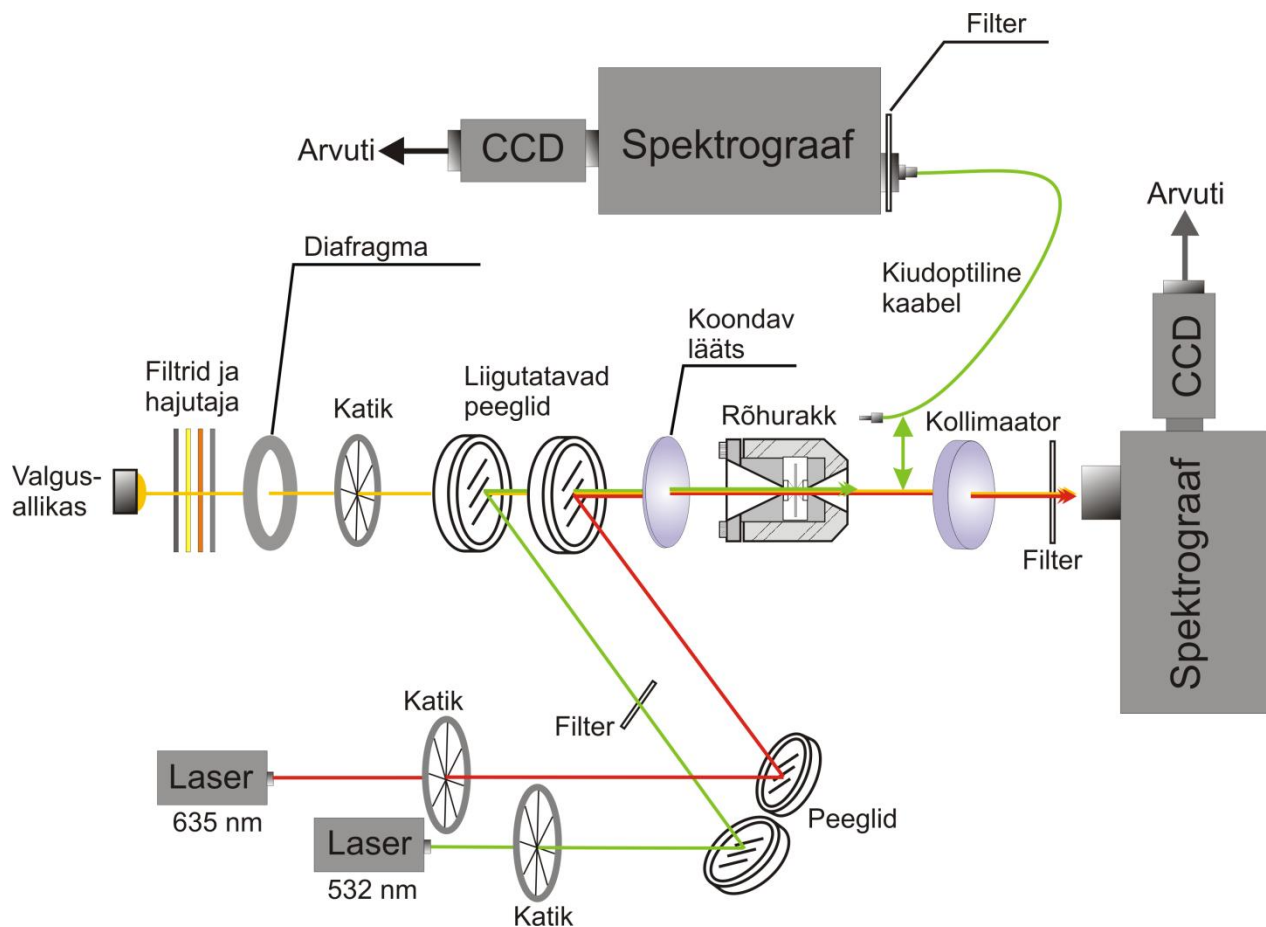
infrapunapiirkonnas mõõtmiseks kasutati spektrograafi võret, millel on 150 joont mm kohta ja maksimaalne tundlikkus 800 nm juures. Nähtava valguse piirkonnas mõõtmiseks kasutati võret, millel on 600 joont mm kohta ja maksimaalne tundlikkus 500 nm juures. Esimese võrega on võimalik spektrit mõõta ~550 nm ulatuses, kuid teisega vaid ~130 nm ulatuses. Spektrograafi pilu laius oli seatud 50  $\mu\text{m}$ -le, mis vastab spektraalsele lahutusele 1,08 nm või 0,26 nm sõltuvalt võrest.

Neeldumisspektrite mõõtmisel kasutati valgusallikana volframist hõõgniidiga (temperatuur 2700 K) lampi, mille kiire teel olid hajutaja ja filtrid (Gost 9411–66) OS-11 ja OS-12. Filtrid OS-11 ja -12 lõikavad ära lainepikkused vastavalt kuni 535 ja 555 nanomeetrini. Küvetis (Hellma Analytics, 10 mm) normaalingimustel mõõtmiseks kasutati lisaks filtrit NS-13, mis vähendab lähi-infrapunapiirkonnas läbituleva kiirguse intensiivsust 82% või rohkem. Kiirgusspektrite mõõtmiseks oli vaja proov ergastada laserdiodiga, mille lainepikkus on 635 nm. Laserdiodi välja filtreerimiseks kasutati KS-17 filtrit, mis lõikab ära 680 nm lühemad lainepikkused. Laserdiodi võimsust mõõdeti võimsuse mõõtjaga 842-PE (Newport).

Automaatse katikuga varustatud süsteem registreeris neeldumisspektri iga 5 minuti järel 2–8 ööpäeva jooksul vastavalt katse tingimustele. Rõhku mõõdeti iga katse jaoks kuni 10 korda.

CD-spektromeetria katseteks sisestati proov kas 1 mm või 0,1 mm paksusega kvartsküveti (Hellma Analytics SUPRASIL), mis asetati omakorda CD-spektromeetrisse (Applied Photophysics CD/ORD/LD LAAPD Detector Chirascan plus). CD-spektromeetri töövahemik on 160–1150 nm ja sellega on võimalik mõõta tsirkulaarse dikroismiga paralleelselt ka neeldumist. Kõigis CD-spektromeetria katsetes hoiti proovi 29 °C ( $\pm 0.05$  °C) juures Quantum Northwest Temperature Control TC125 abil.

Kõik LH1 ja RC-LH1-PufX neeldumis-, kiirgus- ja CD-spektrid mõõdeti puhvri spektri suhtes.



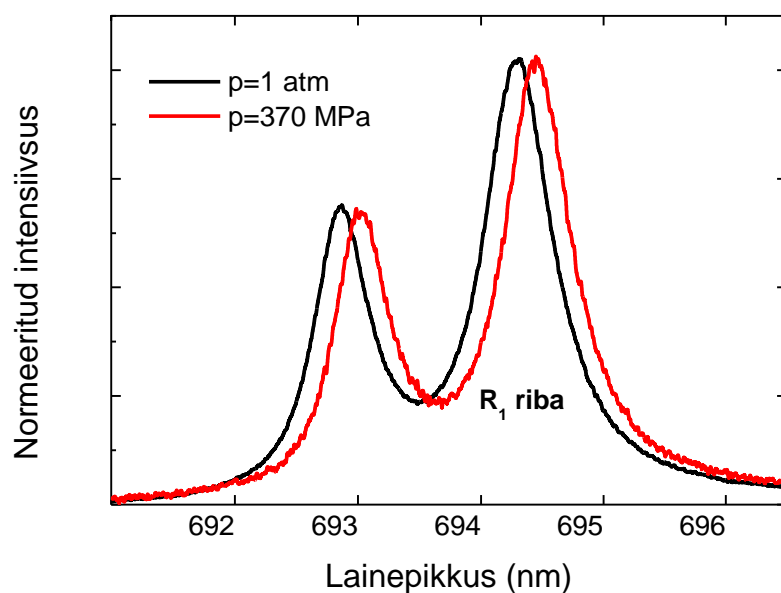
**Joonis 8. Kolm ühendatud optilist süsteemi. Rõhu mõõtmise süsteem koosneb laserist (532 nm), katikust, peeglitest, filtrist, läätses, rõhurakust, optilisest fiibrist ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamerast. Kiire tee selles süsteemis on tähistatud rohelisega. Proovi neeldumisspektri registreerimiseks mõeldud süsteem sisaldab valgusallikat, filtreid, hajutajat, diafragma, katikut, koondavat lääts, rõhurakku, kollimaatorit ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamerat. Kiire tee on tähistatud kollasega. LH1 kiirgusspektri mõõtmiseks tuleb proov ergastada laseriga (635 nm), mille kiir juhitakse peeglite abil läbi lääts ja rõhuraku. Kiire teekond on märgitud punasega. Liina Kanguri joonist on autori loal mugandanud ja täiendanud Hain Salujärv ja Marit Puusepp.**

### 3.4 Andmete töötlemine

Teemantalasi-rõhurakus oleva hüdrostaatilise rõhu suurus määrati rubiini kiirgusspektri  $R_1$  riba (vt joonis 9) Lorentzi jaotusfunktsiooni lähenduse abil leitud maksimumi asukoha järgi, arvestades, et  $R_1$  riba nihkub kiirusega  $-0.768 \frac{1}{\text{cm} \times \text{kbar}}$  (Grasset, 2001). Miinus tähistab rubiini spektri punanihet (vt joonis 9). Rõhu väärtuste laiendmääramatus 95%-sel usaldusnivool

(kattetegur 1,96) on  $\pm 10$  MPa, mis on kooskõlas varasemate tulemustega (Grasset, 2001). Värsked katsed on küll näidanud, et rubiini spektrinihke kasutamine rõhu määramiseks võib olla ebatäpsem meetod kui seni arvatud (personaalne kommunikatsioon Mihkel Pajusaluga). Suurim määramatuse allikas on mõõtevahend ehk spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera (EEV30-11, Andor Technology), mis kalibreeriti reeperlambi Ne-joone (692,94673 nm) ja Ar-joone (696,54307) Lorentzi lähenduste abil.

Kvantitatiivseks kirjeldamiseks tuleb spektrid esitada energiale vastaval skaalal. Traditsiooniliselt mõõdetakse spektreid aga funktsioonina lainepikkusest, mis on energiaga pöördvõrdeline. Parema jälgitavuse huvides on kõigil käesoleva töö joonistel säilitatud lainepikkuse skaala, kuid selle ühik muutub lainepikkusega pöördvõrdeliselt.



**Joonis 9. Rubiini kiirgusspektrid normaalarõhul ning 370 MPa juures (mugandatud Puuseppa (2013) joonist).**

Katsetes, kus intaktne LH1 (B875) dissotsieerus heterodimeerideks B825, normeeriti neeldumisspektritealused pindalad. Spektrialune pindala väljendab LH1 ning selle subühikute summaarset kontsentratsiooni, mis ei tohiks tulenevalt dipooljõudude jäävusest (Parson, 2007) katse jooksul muutuda. Lahutades igast neeldumisspektrist sobiva kordajaga esialgset (või konstrueeritud) B875 neeldumisspektrit, leiti B875 optilise tiheduse muutumine ajas, mis vastab

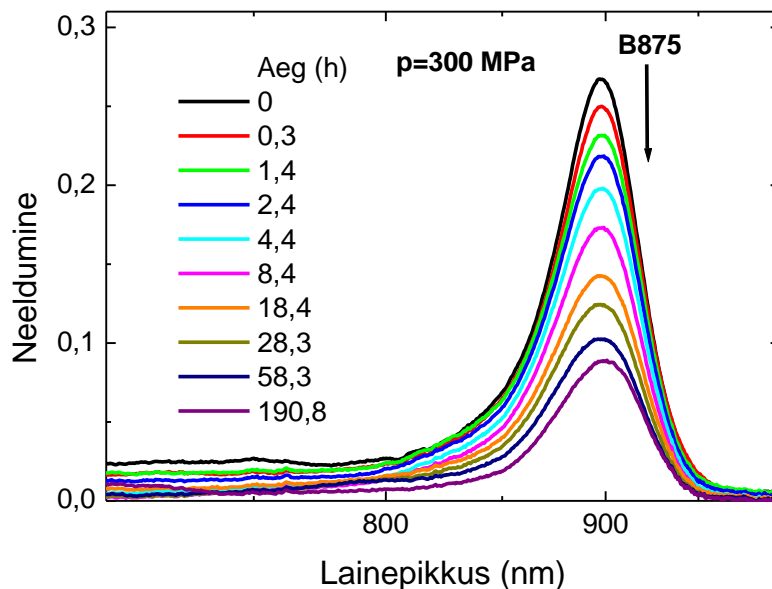
kontsentratsiooni muutumisele (Campbell ja Dwek, 1984). Kõigi katseandmete töötlemiseks kasutati Microcal Origin (Microcal Software, Inc) programmi (versioon 6.0).

CD-spektreid ja CD-spekromeetriga mõõdetud neeldumisspektreid töödeldi lisaks Microcal Originile programmi Pro-Data Viewer (Applied Photophysics) abil. Valgu sekundaarstruktuuri analüüsimiseks kasutati programmi DichroWeb (Whitmore ja Wallace, 2004; Whitmore ja Wallace, 2008) CDSSTR algoritmiga (Compton ja Johnson, 1986; Manavalan ja Johnson, 1987; Sreerama ja Woody, 2000). Võrdluseks kasutati membraanivalke sisaldavat SMP180 andmebaasi (Abdul-Gader *et al.*, 2011) ja denatureeritud valke sisaldavat andmebaasi 3 (Sreerama *et al.*, 2000).

## 4 Tulemused

### 4.1 Kõrge rõhu mõju LH1 standardproovile

Standardproov ehk isoleeritud LH1 proov, millele ei ole lisatud täiendavat detergenti, on normaaltingimustel täiesti stabiilne. Kaheksa ööpäeva jooksul tehtud mõõtmised näitavad, et ka kõrge hüdrostaatilise rõhu (300 MPa) ja 29 °C juures ei toimu LH1 dissotsiatsiooni subühikuteks (Puusepp *et al.*, 2015; vt lisa 2), kuigi intaktse LH1 ringi ehk B875 riba intensiivsus kahaneb aeglaselt (vt joonis 10). Neeldumise intensiivsuse kahanemine ei tulene proovi lekkimisest, kuna vastasel juhul ei oleks rõhk katse jooksul stabiilne. Intensiivsuse kahanemist võib põhjustada pigmentide lagunemine nt hapniku mõjul. Suurem osa laguprodukte peab seejuures jääma väljapoole uuritavat spektrivahemikku. See probleem vajab edaspidi põhjalikumat uurimist.

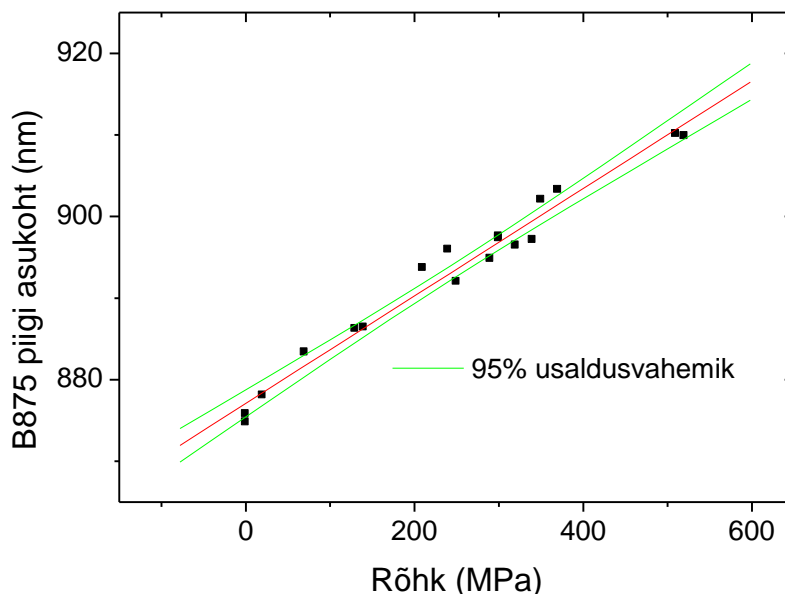


**Joonis 10. LH1 standardproovi stabiilsus kõrge hüdrostaatilise rõhu all (rõhu väärtus märgitud siin ja edaspidi joonisel).**

B875 riba maksimumi asukoht näib katse alguses ja lõpus veidi nihkuvat. See nihe ei kajasta muutusi rõhus või temperatuuris (mis olid katse vältel konstantsed), vaid on seotud optilise mõõtesüsteemi (vt joonis 8) suure tundlikkusega vibratsioonide ja muude häirituste suhtes. Käesoleval juhul korreleeruvad spektrinihked automaatse mõõtesüsteemi (taas)käivitamisega,



mis viitab katikute avamisest ja sulgemisest tingitud vibratsioonile või muudele mehaanilistele mõjudele.



**Joonis 11. LH1 B875 riba maksimumi asukoha sõltuvus rõhust (13 mM DHPC,  $t=29\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Lineaarne lähendus on tähistatud punase joonega.**

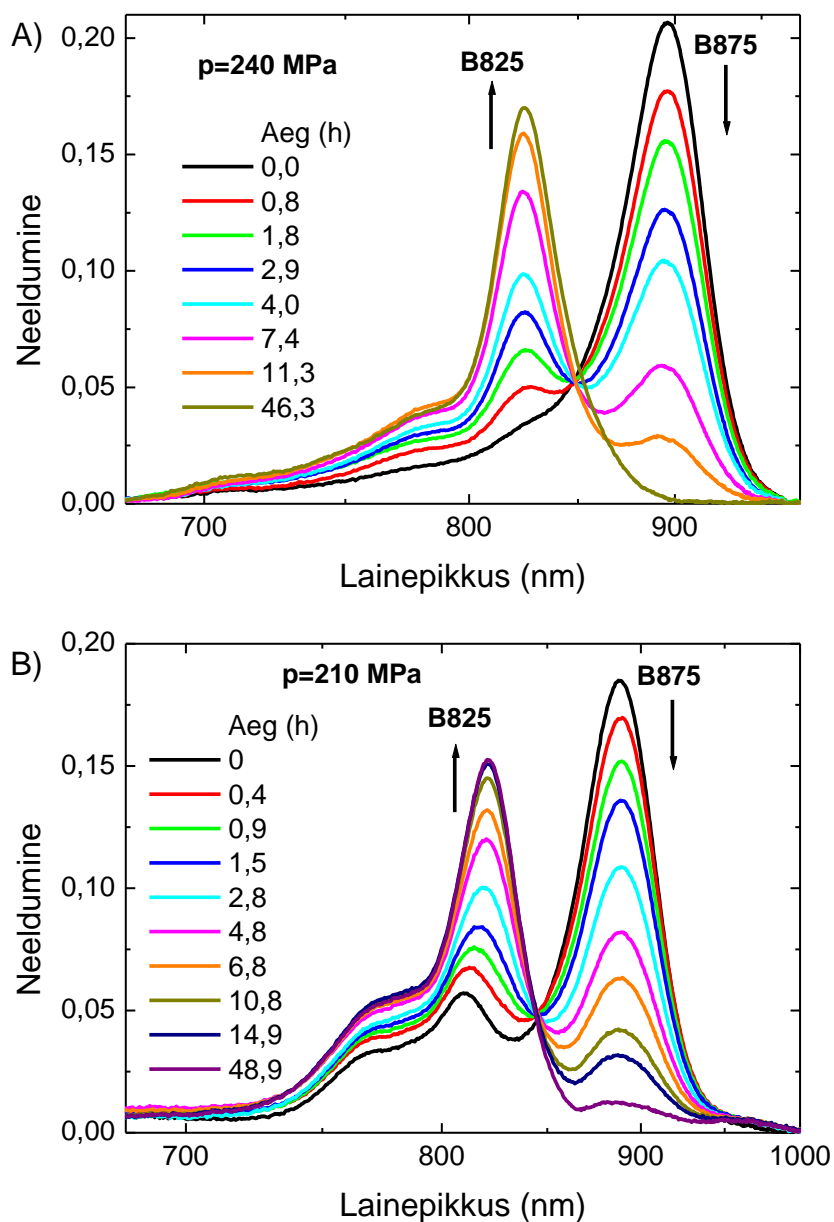
Rõhu toimel nihkub B875 riba maksimumi asukoht kõrgemale lainepikkusele (Freiberg *et al.*, 1993; Sturgis *et al.*, 1998). Hüdrostaatilise rõhu ja B875 riba maksimumi asukoha vahel on kuni ~600 MPa-ni lineaarne sõltuvus, mida demonstreerib joonis 11. Sama on isoleeritud RC-LH1 kompleksi kohta näidanud Freiberg *et al.* (2012). *Rb. sphaeroides*'e B875 riba punanihkega kaasneb riba laienemine. Nii nihe kui laienemine on seletatavad eksitonefektidega (Timpmann *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998). Rõhu langetamisel taastuvad spektri esialgne asukoht ja kuju, kuid mitte intensiivsus.

## 4.2 Detergendi liiaga destabiliseeritud LH1 dissotsiatsioon kõrge hüdrostaatilise rõhu all

### 4.2.1 LH1 ringi dissotsiatsioon heterodimeerideks B825

Dissotsiatsiooni uuriti neeldumisspektrites toimunud muutuste järgi. Kõrge hüdrostaatilise rõhu ja 13 mM detergendi DHPC kontsentratsiooni toimel dissotsieerub isoleeritud LH1 ring (B875) aeglaselt, kuid praktiliselt täielikult heterodimeerseteks subühikuteks B825. Kõrge rõhu katseseerias kasutati rõhke vahemikus 20–860 MPa. B875 ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ) dissotsiatsiooni

B825-ks ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ) illustreerib joonis 12A, kus on näitena toodud ligikaudu kaks ööpäeva kestnud dissotsiatsiooniprotsess 240 MPa juures (Puusepp *et al.*, 2015). Spektrites ilmneb isobestiline punkt (ehk punkt, kus neeldumine katse jooksul ei muutu) 849 nm piirkonnas. Isobestilise punkti olemasolu näitab, et reaktsiooni käigus ei teki olulisel määral vaheprodukte.



**Joonis 12. A) Isoleeritud LH1 (B875) dissotsiatsioon 13 mM DHPC ja kõrge hüdrostaatilise rõhu all (Puusepp *et al.*, 2015). B) Isoleeritud RC-LH1-PufX kompleksi dissotsiatsioon kõrge rõhu ning 13 mM DHPC mõjul.**

Dissotsiatsiooni universaalsuse näitamiseks uuriti ka isoleeritud natiivse RC-LH1-PufX kompleksi neeldumisspektreid kõrge rõhu (210 MPa) ja 13 mM DHPC kontsentratsiooni juures (vt joonis 12B). Katse tulemustest nähtub, et ka natiivne kompleks dissotsieerub rõhu ja detergendi toimel suuresti heterodimeerseteks subühikuteks B825. Neeldumise intensiivsuse kasv 777 nm piirkonnas on seotud heterodimeeri kõrgema energiaga eksitonüleminekuga (vt peatükk 4.2.3) ja heterodimeeri pöörduva dissotsiatsiooniga monomeerideks (vt peatükk 4.2.5 ja lisa 1.2). Proovi dissotsiatsioon algab kohe pärast detergendi lisamist, seetõttu võib rõhu pealekeeramise hetkeks (ajahetk 0 joonisel 12B) olla proov juba osaliselt dissotsieerunud. Rõhu tõstmise mõju osaliselt dissotsieerunud proovile on samuti kirjeldatud lisa 1.2.

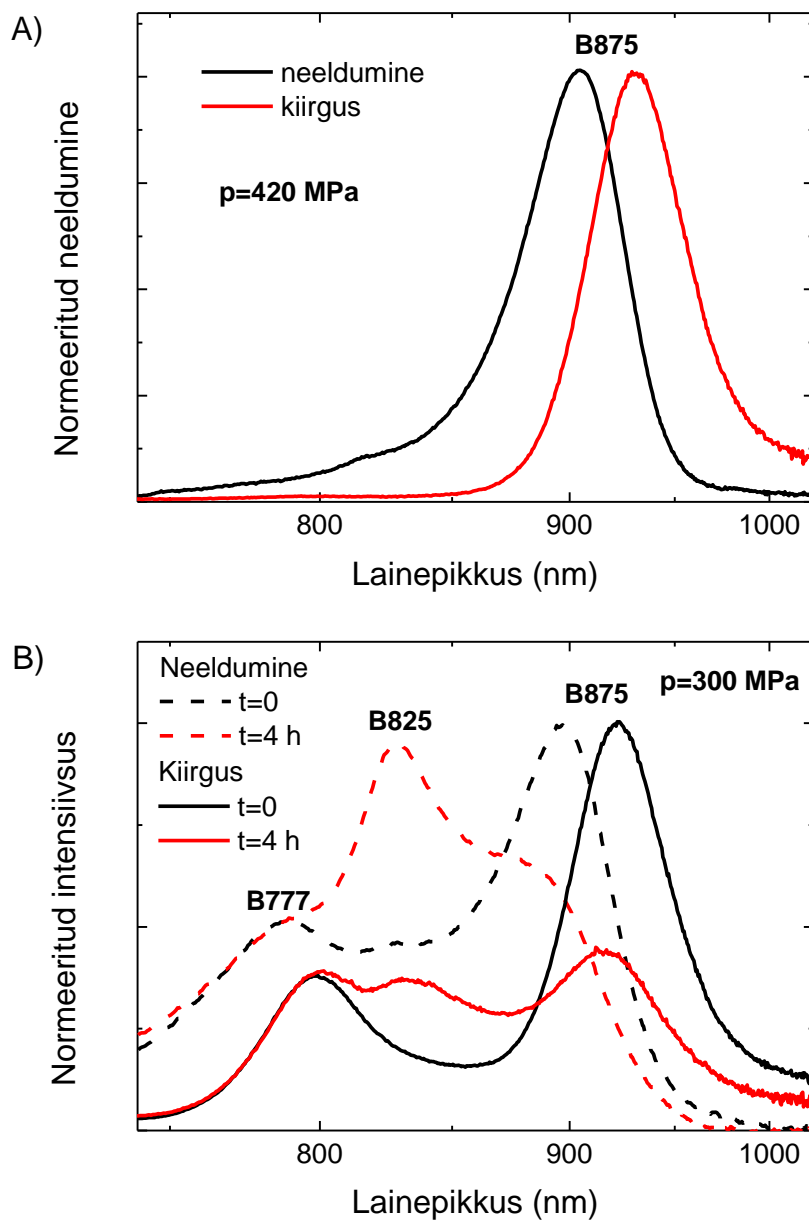
Neeldumisribade maksimumide ajas muutuv asukoht (vt joonis 12B, kuid ka järgnevides tulemustes) on seotud ribade läheduse ja osalise kattumisega, nii et LH1 erinevate subühikute tekkimine dissotsiatsiooni käigus ja sellele vastav neeldumise kasv mõjutab naaberribade maksimumide asukohti.

#### 4.2.2 LH1 ringi dissotsiatsiooniproductide fluorestsents

Tõestamaks, et B875 kiirgus tõepoolest väheneb või kaob LH1 dissotsiatsiooni tõttu ning samaaegselt B825 fluorestsentsi intensiivsus kasvab heterodimeeride eraldumisel LH1 ringist, uuriti LH1 kiirgusspektreid (Puusepp *et al.*, 2015). Joonisel 13A on kujutatud LH1 standardproovi kiirgus- ja neeldumisspektrid 400 MPa juures. Tulemus kinnitab veelkord, et täiendava detergendita LH1 ei dissotsieeru. Samas toimub 13 mM DHPC-ga proovis 300 MPa juures intensiivne LH1 kompleksi dissotsieerumine heterodimeerseteks subühikuteks B825 (vt joonis 13B). Dissotsiatsioon on osaliselt toimunud juba detergendi lisamise käigus, sest mõõtmise alguses (ajahetkel 0) on monomeeri B777 kiirgus- ja neeldumisribad selgelt nähtavad.

Tähelepanuväärselt on kiirgusspektris B825 intensiivsus suhteliselt oluliselt nõrgem kui neeldumisspektris. Seda võib põhjustada heterodimeeride lähedus dissotsieeruvale LH1 kompleksile, nii et ergastatud seisundi eluea jooksul toimub piiratud ulatusega energiaülekanne B825-lt LH1 osaliselt lagunenud kaarele (Bahatyrova *et al.*, 2004). Viimast kinnitab ka B875 riba ajaga süvenev sininihe 13 mM DHPC-ga proovis võrreldes B875 riba asukohaga standardproovis. Nii kiirgus- kui neeldumisspektris on lisaks B875-le ja B825-le näha ka monomeerne B777 ( $\alpha_1$ BChl<sub>I</sub> või  $\beta_1$ BChl<sub>I</sub>) komponent. Monomeerid tekivad arvatavasti detergendi lisamise järel heterogeense LH1 (Bahatyrova *et al.*, 2004) proovi ebastabiilsete

komponentide kiire dissotsiatsiooni tõttu. B777 riba intensiivsus kiirgusspektris näitab, et B777 ergastuste funktsionaalset energiaülekannet LH1 ringile ei toimu.



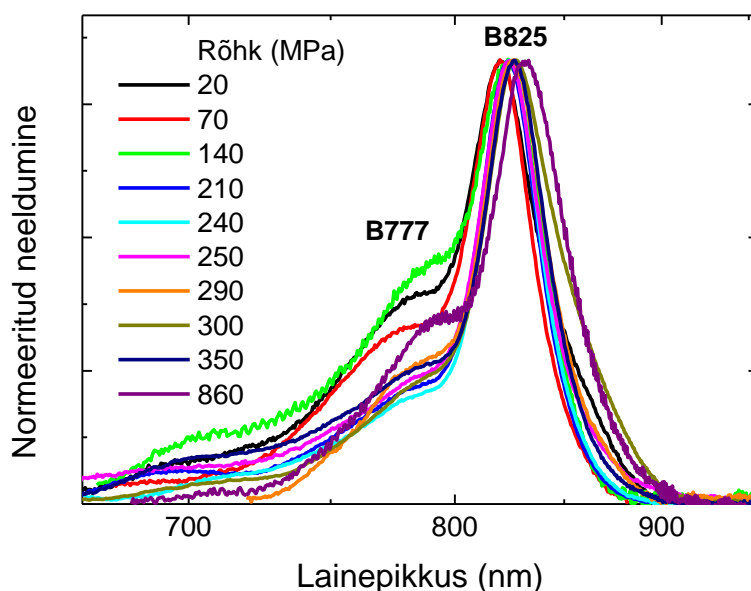
**Joonis 13. A) Standardproovi neeldumis- ja kiirgusspekter kõrge rõhu all. B) LH1 kiirgus- (pidev joon) ja neeldumisspektrid (katkendjoon) kõrge rõhu all 13 mM DHPC-ga (Puusepp *et al.*, 2015). Must tähistab esialgset ja punane neli tundi hiljem mõõdetud spektrit.**

LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks on (osaliselt) pöörduv protsess. Rõhu langetamisel assotsieerub mingi hulk heterodimeere tagasi LH1 ringiks (vt lisa 1.1).

#### 4.2.3 Heterodimeerse subühiku B825 neeldumisspektri kuju

Eksitoninteraktsioonis oleval heterodimeeril B825 võib olla kaks energiaüleminekut iga monomeeri energiaülemineku kohta (van Amerongen *et al.*, 2000). Kumb dimeeri kahest üleminekust on tõenäolisem, sõltub eksitoninteraktsioonis olevate molekulide orientatsioonist (Campbell ja Dwek, 1984). *Rb. sphaeroides*'e LH1 heterodimeeri madalama energiaga üleminek 825 nm piirkonnas on tugevam kui vastav kõrgema energiaga üleminek, mis asub 777 nm piirkonnas (Parkes-Loach *et al.*, 2004). Seega kattub heterodimeeri kõrgema energiaga üleminek monomeerse subühiku B777 neeldumisribaga, raskendades tema uurimist.

Monomeeri neeldumisriba ja heterodimeeri kõrgema energiaga ülemineku eristamiseks võrreldi omavahel erinevates katsetes mõõdetud kõige selgemini väljendunud B825 ribaga spektreid (vt joonis 14).



**Joonis 14.** Heterodimeeri kõrgema energiaga eksitonülemineku ja monomeeri neeldumisriba eristamine 777 nm piirkonnas. Erinevatel rõhkudel leitud B825 neeldumisribad on normeeritud maksimumi intensiivsuse järgi.

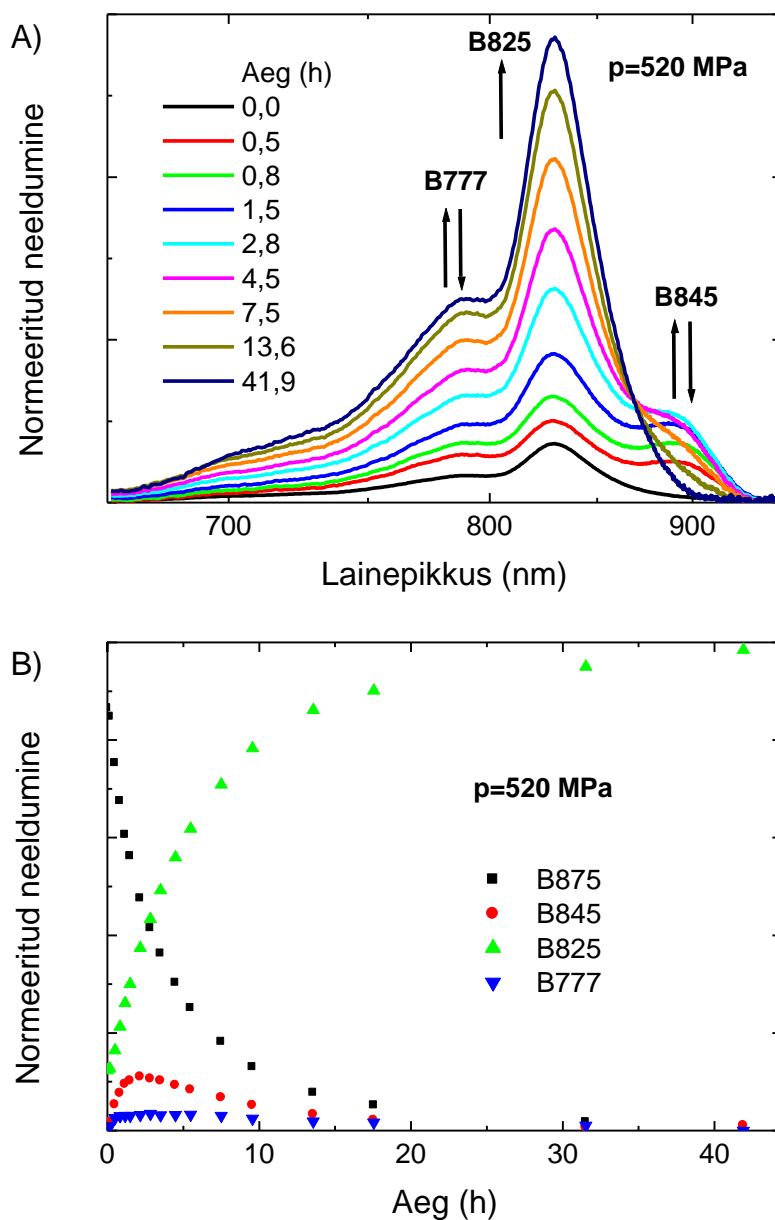
Madalama (20; 70 ja 140 MPa) ja kõrgema rõhu (860 MPa) juures tehtud katsetes on 777 nm piirkonnas proportsionaalselt tugevam neeldumine kui vahepealsete rõhkude juures (210–350 MPa). Seega võib oletada, et võrdlemisi konstantne neeldumine 777 nm piirkonnas 210–350 MPa juures tuleneb heterodimeeri kõrgema energiaga eksitonülemineku püsivast panusest, samas kui madalatel ja väga kõrgetel rõhkudel on soodustatud monomeerse subühiku B777 teke. Tulemus viitab sellele, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust. Teades heterodimeeri kõrgema energiaga eksitonülemineku neeldumist, on võimalik leida või konstrueerida heterodimeerse ja monomeerse subühiku etalonspektrid iga konkreetse katse jaoks, mis lihtsustab vastavate spektrite analüüsi.

Kõrgema energiaga eksitonülemineku leidmine *Rb. sphaeroides*'e heterodimeeri spektris on tähelepanuväärne, kuna hästi uuritud *Rs. rubrum*'i heterodimeeril analoogne riba praktiliselt puudub (Wang *et al.*, 2003). See tähendab, et bakterklorofüllide orientatsioon *Rs. rubrum*'i ja *Rb. sphaeroides*'e heterodimeeris (ja ilmselt ka nende LH1-s) peab olema erinev.

#### 4.2.4 Dissotsiatsiooni tetrameerne ( $\alpha_2\beta_2$ BChl<sub>4</sub>) vaheprodukt B845

LH1 spektrite lähem uurimine paljastas, et dissotsiatsiooni käigus tekib 845 nm piirkonnas nõrgalt neelav vaheprodukt B845 (vt joonis 15A) (Puusepp *et al.*, 2015). Sarnaselt avastasid Végh ja Robert (2002) *Rs. rubrum*'i LH1-te uurides subühiku B851, mis leiti koosnevat kahest B820 subühikust. Selline vaheprodukt esines ka *Rs. rubrum*'i heterodimeeride assotsiatsioonil LH1 ringiks (Pandit *et al.*, 2001). Puusepp *et al.* (2015) hüpoteesi kohaselt on *Rb. sphaeroides*'e B845 subühik *Rs. rubrum*'i B851 vaste ehk samuti tetrameer ( $\alpha_2\beta_2$ BChl<sub>4</sub>).

LH1 dissotsiatsioon tetrameeriks näib mõõdukate rõhkude juures (<500 MPa) olevat aeglasem, kui tetrameeri edasine dissotsiatsioon heterodimeerideks, sest B845 riba neeldumisspektrites eristataval kujul ei esine. Väga kõrgetel rõhkudel (>500 MPa) hakkab aga tetrameer esialgu akumul eeruma, mis näitab, et rõhk vähendab B845 dissotsiatsiooni kiirust võrreldes B875 dissotsiatsiooniga. Katse lõpuks on aga tetrameer praktiliselt täielikult dissotsieerunud heterodimeerideks B825. Joonisel 15B on näha ka monomeerse subühiku B777 vähesel hulgal akumul eerumine ja sellele järgnenud kadumine. Monomeersest subühikust on pikemalt juttu peatükis 4.2.5 ja lisa 1.2. Nii tetrameeri kui monomeeri akumul eerumine viitavad taas sellele, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust.



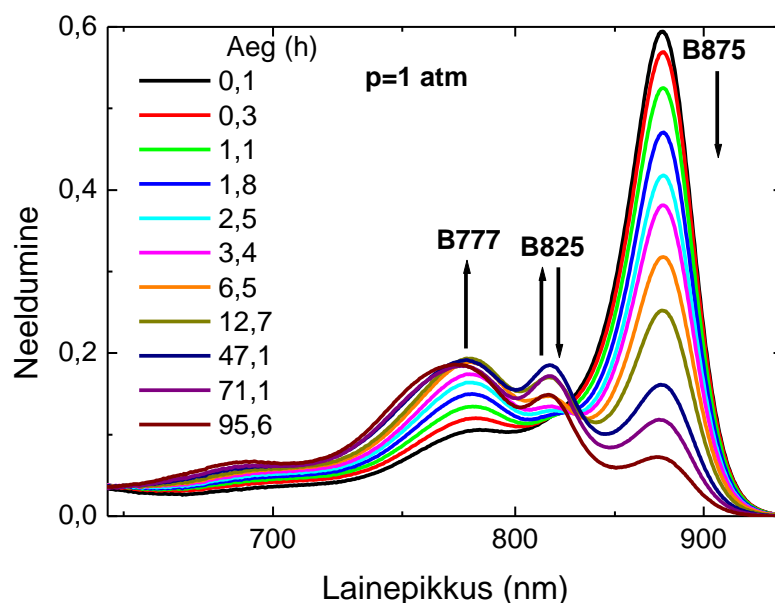
**Joonis 15. A) Vaheühendi B845 akumulatsioon ja kadumine väga kõrge rõhu juures (Puusepp *et al.*, 2015). Selguse huvides on B875 riba spektritest maha lahutatud. B) B875, B845, B825 ja B777 (monomeeri) suhteline neeldumine sama katse vältel (Puusepp *et al.*, 2015).**

#### 4.2.5 LH1 dissotsiatsioon normaalarõhul

Teemantlasi-rõhurakuga ei ole võimalik fikseerida rõhkusid, mis on väiksemad kui 10 MPa. Varasemad katsed nn minimaalsel rõhul (<10 MPa) lõppesid lahkumisevate tulemustega

(Puusepp, 2013). Sageli lagunes LH1 näiliselt otse monomeerideks B777 või toimus küll B875 dissotsiatsioon heterodimeerideks, kuid sellele järgnes heterodimeeri edasine lagunemine monomeerideks. Seepärast uuriti LH1 dissotsiatsiooni 13 mM DHPC juures ka normaalarõhul küvetis temperatuuril 25 °C (Puusepp *et al.*, 2015) (vt joonis 16).

Selles katses on tähelepanuväärne B875 intensiivsuse kiire langus, samas kui heterodimeere tekib monomeeridega võrreldes väga vähe. Heterodimeer B825 näib edasi dissotsieeruvat monomeerideks B777. Monomeeri piirkonnas on omakorda märgatav sininihe, mida põhjustab ilmselt bakterfeofütiini tekkimine (bakterklorofüll kaotab oma tsentraalse Mg aatomi). Kuna avatud küvetis on hapniku mõju proovile oluliselt suurem kui teemantalasi-rõhurakus, ei ole B875 intensiivsuse kiire langus ega ka bakterklorofüllü oksüdatsiooniproducti olemasolu 690 nm piirkonnas üllatav. Makhneva *et al.* (2007) on kirjeldanud sarnast heterodimeeride oksüdatsiooniproducti *Allochrochromatium minutissimum*'is 702 nm juures.



**Joonis 16. LH1 dissotsiatsioon normaalarõhul ja temperatuuril 25 °C 13 mM DHPC juures (Puusepp *et al.*, 2015).**

Need tulemused näitavad, et väga madalatel rõhkudel (<10 MPa) toimub lisaks intaktse LH1 dissotsiatsioonile heterodimeerideks nende järgnev dissotsiatsioon monomeerideks, kusjuures reaktsiooni kiirust limiteerivaks protsessiks võib sõltuvalt tingimustest (nt rõhk, mida ei ole



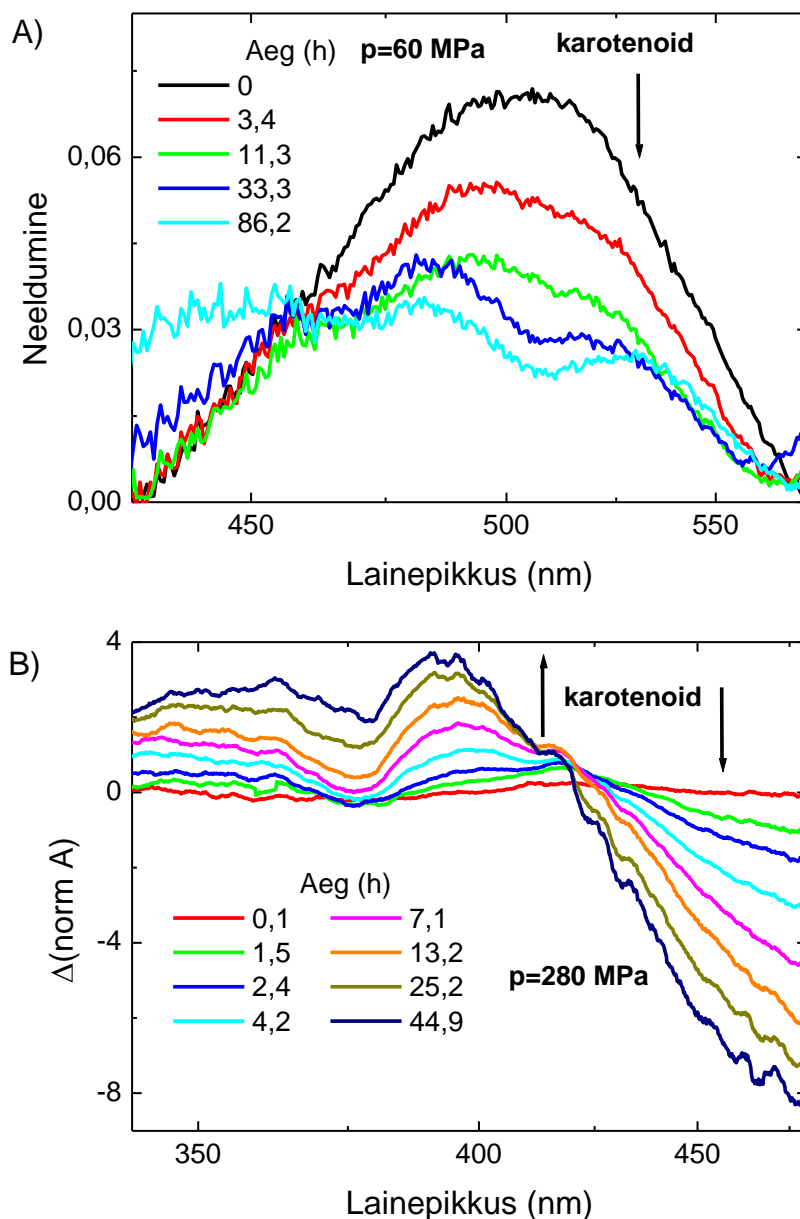
olemasolevate vahenditega täpsemini võimalik määrata) osutada kas LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks või heterodimeeride edasine dissotsiatsioon monomeerideks.

Seejuures viimane on rõhust sõltuvalt pöörduv protsess. Kui madalatel rõhkudel toimus heterodimeeri dissotsiatsioon monomeerideks, siis kõrge rõhu juures on eelistatud monomeeride assotsiatsioon heterodimeerideks (vt lisa 1.2). Heterodimeeri-monomeeri tasakaalu mõjutavad ka proovi stabiilsus ja heterogeensus. Monomeeride assotsiatsioonil heterodimeerideks võib esineda hüperkromism (vt lisa 1.3). Teatud tingimustel võivad monomeerid heterodimeerideks assotsieerumise asemel agregeeruda suuremateks kompleksideks (vt lisa 1.4).

#### 4.2.6 Dissotsiatsiooni mõju karotenoidi ja valgu spektritele

LH1 dissotsiatsiooni heterodimeerideks on seni vaadeldud bakterklorofüllil kui spektroskoopilise markeri abil infrapunapiirkonnas, kuid LH1 lagunemine peab avalduma ka karotenoidide ja valgu spektrites.

Joonise 5A järgi asub normaalrõhul karotenoidi laia neeldumisriba maksimum 510 nm juures. Mõõduka rõhu all (60 MPa) nõrgeneb see neeldumine kiiresti ja karotenoidi maksimum nihkub sinisesse (vt joonis 17A). Ühtlasi muutub riba struktuurseks. Nii maksimumi nähtavat nihet kui ka struktuuri teket võib seletada uuritud proovi heterogeensusel. LH1 sisaldab kaht erinevat karotenoidi: sferoideeni ja sferoidenooni (Shneour, 1962). Sferoidenooni neeldumisriba (maksimumiga 510 nm) on lai ja struktuuritu ning, võrreldes sferoideeni spektriga, punasesse nihutatud (Šlouf *et al.*, 2012). Sferoideeni spekter on vastupidi suhteliselt kitsas ja selgelt väljendunud võnkestruktuuriga. Sferoideeni teisele vibroonsele üleminekule vastav maksimum asub lainepikkusel ~480 nm (Šlouf *et al.*, 2012). Kirjandusest pole teada, kas nimetatud kaks karotenoidi esinevad juhuslikus suhtes samaaegselt kõikides LH1 ringides või organiseeruvad nad valikuliselt kindlatesse LH1 kompleksidesse. Viimasel juhul on proovis vaid kahte tüüpi komplekse: ühes on karotenoidiks sferoideen ja teises sferoidenoon. Joonis 17A lubab järeldada, et suure tõenäosusega realiseerub selektiivne jaotus. Samuti võib järeldada, et sferoideeniga assambleerunud LH1 kompleksid on stabiilsemad kui sferoidenooni sisaldavad kompleksid.



**Joonis 17. A) Karotenoidi riba neeldumisspektrid 510 nm piirkonnas LH1 dissotsiatsiooni käigus kõrge rõhu all. B) Karotenoidi riba pindala järgi normeeritud neeldumise muutus võrreldes esialgse spektriga ~350–475 nm piirkonnas LH1 dissotsiatsiooni käigus kõrge hüdrostaatilise rõhu all.**

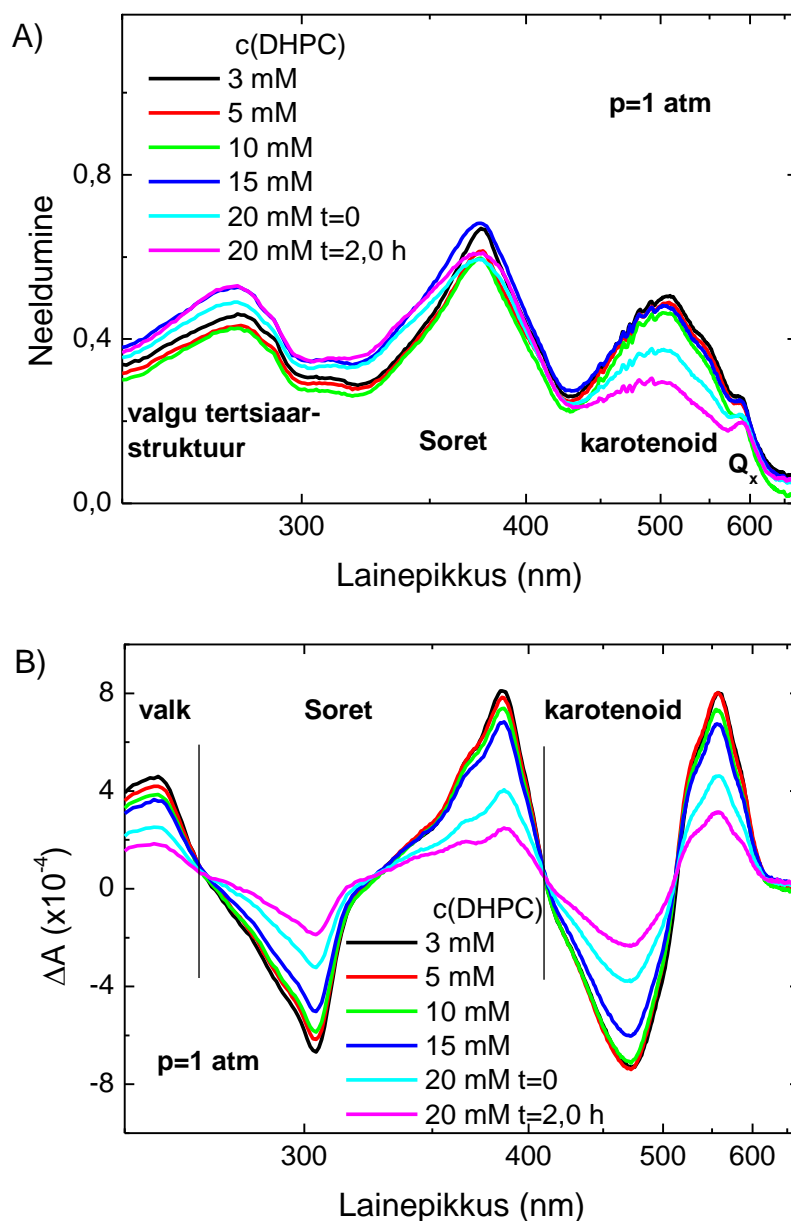
Järgnevalt (vt joonis 17B) uuriti spektrit ~350–475 nm piirkonnas ning kõrgemal rõhul (280 MPa), mis võimaldab otsest võrdlust joonisel 12 toodud tulemustega. Joonisel 17B on kujutatud pindala järgi normeeritud neeldumise vahe ( $\Delta A$ ) võrreldes esialgse spektriga. Nüüd võib selgelt

näha, et karotenoidi neeldumises leiab paralleelselt LH1 dissotsiatsiooniga (vt joonis 12A) aset oluline muutus. Neeldumise vähenemine spektri pikalainelises osas ( $>419$  nm) põhjustab neeldumise kasvu spektri lühilainelises (358 ja 392 nm) piirkonnas. Jälgitud muutuste esmaseks põhjuseks (vt joonis 3) võib olla karotenoidi molekulide vahelise eksitonsideme katkemine LH1 kompleksi dissotsiatsioonil heterodimeerideks, karotenoidide eksponeerimine lahusesse ning sellega kaasnev konformatsiooni muutus. LH1 dissotsiatsioonil kõrgel rõhul võivad karotenoidid kompleksist hoopiski vabaneda (analoogselt bakterklorofüllil B777 vormiga), mis võib põhjendada karotenoidi riba veelgi suuremat sininihet kui joonisel 17A.

Karotenoidide spektraalseid omadusi sellistel tingimustes pole seni uuritud. Probleemi teeb veelgi keerulisemaks karotenoidi signaali kattumine bakterklorofüllil Soret' üleminekute neeldumisega. CD-spektri mõõtmine võiks küsimustele vastuse otsimisel kasuks tulla. Kahjuks oli see aeglase dissotsiatsiooni ja CD-spektromeetri piiratud tööressursi tõttu praktiliselt võimatu. Seepärast uuriti alternatiivse võimalusena LH1 dissotsiatsiooni sõltuvana detergendi kontsentratsioonist normaalrõhul (vt joonis 18).

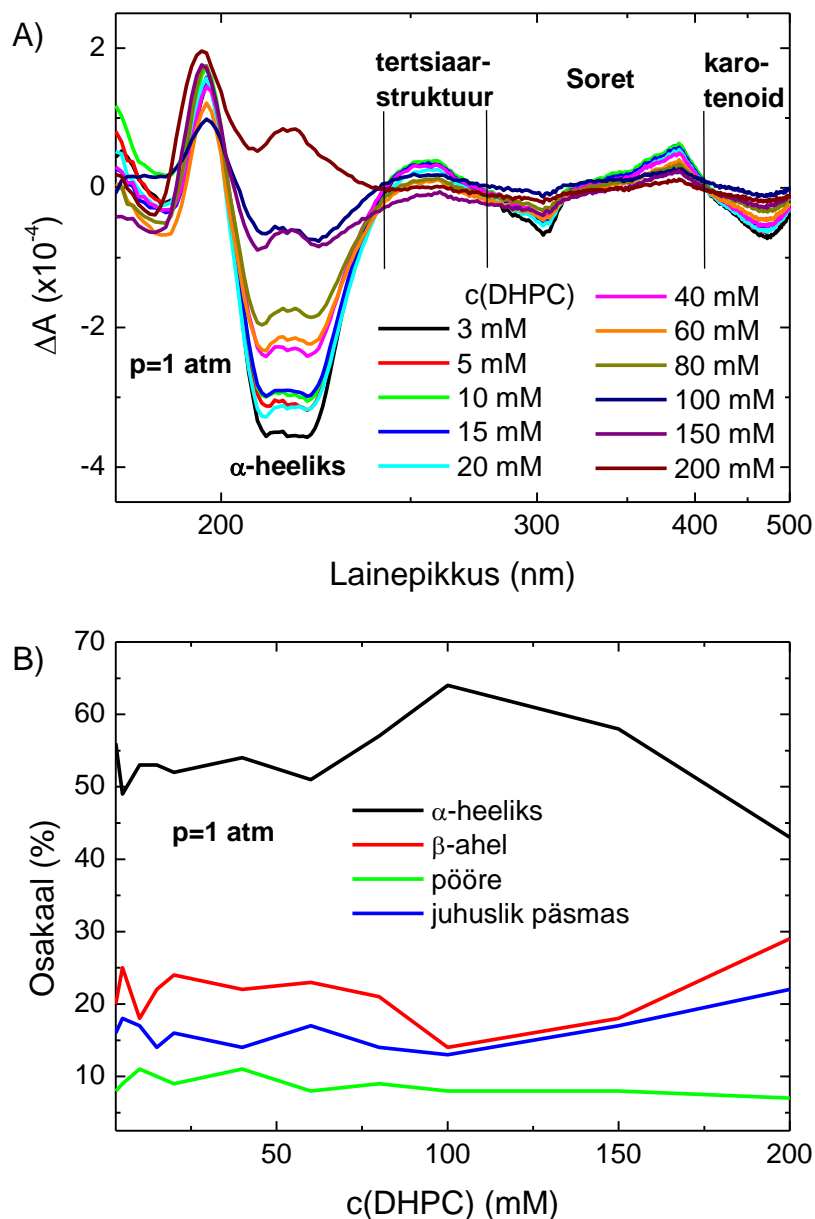
Karotenoidi riba kahanemine ja spektri kasv  $\sim 350$  nm piirkonnas (vt joonis 17B) on suure detergendi kontsentratsiooni korral mõõdetud neeldumisspektrites selgelt näha (vt joonis 18A). Seejuures muutub prominentseks bakterklorofüllil  $Q_x$  riba, mida karotenoidi riba esialgu peaaegu täielikult varjas.

Joonisel 18B kujutatud CD-spekter näitab karotenoidi, Soret' ja valgu tertsiaarstruktuuri ribade kahanemist ja optilise aktiivsuse vähenemist detergendi kontsentratsiooni suurenemisel. Neeldumisspektri intensiivsuse kasvu 350 nm juures CD-spekter ei kajasta. See on kooskõlas asjaoluga, et optiliselt aktiivsed on vaid eksitonsidemes olevad pigmendid. Sideme kaotanud (monomeersed) pigmendid, mis avalduvad 350 nm neeldumise kasvus, optilist aktiivsust ei evi.



**Joonis 18. A) LH1 kompleksi neeldumis- (A) ja CD-spektrid (B) karotenoidi, Soret' ja valgu aromaatsete aminohapete ning tertsiaarstruktuuri eest vastutavate kromofooride neeldumise piirkonnas erinevate detergendi kontsentratsioonide juures normaالرõhul.**

Kõrge DHPC kontsentratsiooni juures kahaneb optiline aktiivsus üle kogu spektri, hõlmates nii bakterklorofüllit (Soret' riba), karotenoide kui ka valgu kromofoore (vt joonis 19A).



**Joonis 19. A) LH1 Soret', karotenoidi, valgu sekundaar- ning tertsiaarstruktuuri CD-ribad erinevate detergendi kontsentratsioonide juures normaalrõhul. B) Sekundaarstruktuuri elementide osahulgad CD-spektrite järgi samas katses.**

CD-spektreid analüüsiti Dichrowebi abil (vt peatükk 3.4) ning tuvastati valgu sekundaarstruktuuri elementide suhteline hulk erinevate detergendi kontsentratsioonide juures (vt joonis 19B). LH1-s

osutus valdavaks sekundaarstruktuuriks  $\alpha$ -heeliks, mis on kooskõlas seniste teadmistega (Hu ja Schulten, 1998).  $\alpha$ -heeliksi osatähtsus proovis paistab esialgu kasvavat. Siinkohal peab rõhutama, et tegu ei ole mitte absoluutse hulgaga, vaid just nimelt osakaaluga. See võib tähendada, et kuigi  $\alpha$ -heeliksid denatureeruvad detergendi toimetel, kaovad teised (näivad) struktuurielemendid veelgi kiiremini. Alates 100 mM DHPC-st hakkab ka  $\alpha$ -heeliksile osatähtsus langema.

LH1 apoproteiinide sekundaarstruktuuri (Hu ja Schulten, 1998) mudeli alusel ei ole põhjust arvata, et need sisaldavad pöördeid või  $\beta$ -ahelaid, seega näitab  $\beta$ -ahelate ja pöörete madal foon meetodi mürataset.  $\beta$ -ahelate osahulga kasv 200 mM DHPC-ga proovis ei tähenda, et alfa-heeliksid muutuksid tugevalt denatureerivates tingimustes  $\beta$ -lehtedeks. Pigem on  $\beta$ -ahelana tuvastatud element denatureerumise (vahe)produkt.  $\beta$ -ahelale spektroskoopiliselt sarnaste struktuuride säilimist denaturatsioonis (aga rõhu all) on kirjeldanud Winter ja Dzwolak (2005). Valgu denatureerimisele viitab ka juhusliku päisma osakaalu tõus proovis.

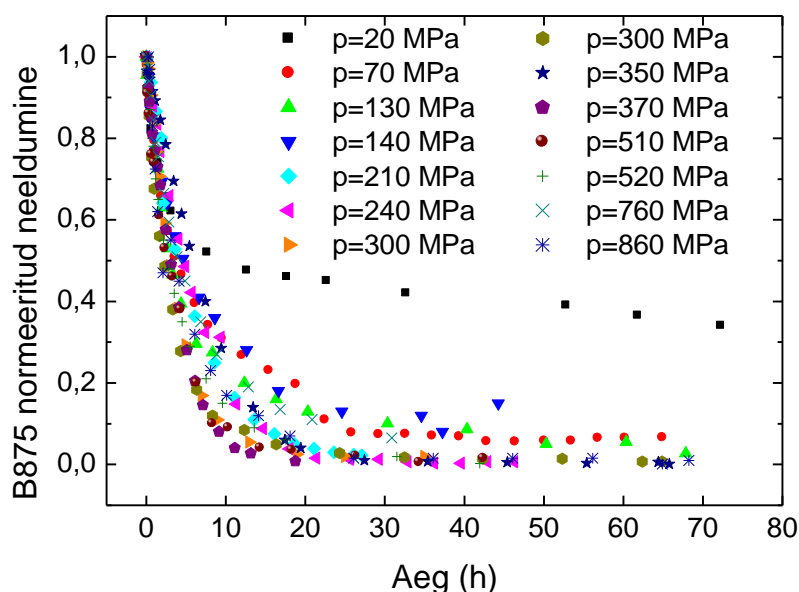
Selle osa lõpetuseks tuleb möönda, et detergendi ja kõrge rõhu mõju LH1 komplekside struktuurile pole päris identne. Selles veendumiseks piisab võrrelda karotenoidi spektreid joonistel 17 ja 18A. Viimasel juhul ei ilmne spektris sferoideenile iseloomulikku vibroonset struktuuri.

Tulevastes uuringutes soovib autor ühendada CD-spektromeetria kõrge rõhu meetoditega, et jätkata fotosünteesiliste komplekside dissotsiatsiooni ja denatureerimise käigus toimuvate struktuursete ja konformatsiooniliste muutuste uurimist nii valgu kui pigmentide osas. Selleks tööks vajalik safiiralasi-rõhurakk on laboril juba tellitud.

## 5 Arutelu

### 5.1 Dissotsiatsiooni mehhanism

Käesolevas töös seni kirjeldatud tulemustes on ilmnenud mitmeid rõhust sõltuvaid erisusi (vt peatükk 4.2.3, 4.2.4 ja 4.2.5), mis viitavad sellele, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust. Joonisel 20 on kujutatud B875 riba pindala järgi normeeritud neeldumise muutumine ajas. Riba pindala korreleerub intaktse LH1 kontsentratsiooniga. Tulemused näitavad ilmekalt rõhust sõltuvaid erinevusi dissotsiatsiooni kulgemises.



**Joonis 20. B875 riba normeeritud neeldumine (kontsentratsioon) sõltuvana ajast erinevatel rõhkudel vahemikus 20–860 MPa.**

B875 kontsentratsioon saavutab kolm erinevat diskreetset platood. Madala rõhu juures (20 MPa) toimuva reaktsiooni mehhanism erineb selgelt kõigist ülejäänutest. Kõrge rõhu juures toimuvad reaktsioonid kulgevad praktiliselt lõpuni ja moodustavad nn nullplato. Vahepeale mahuvad veel 70–140 MPa juures toimunud reaktsioonid, mis moodustavad omaette plato. Väga kõrgete rõhkude juures muutub pilt segasemaks, sest nt 760 MPa juures toimuv reaktsioon kuuluks pigem kokku keskmiste rõhkude platooga.

Sääraseid rõhust sõltuvaid diskreetseid üleminekuid dissotsiatsiooni mehhanismis võivad põhjustada detergendi DHPC faasisiirded. DHPC faasisiirete toimumist ei ole seni suudetud ei visuaalselt ega hajumise uurimise abil tuvastada (Puusepp *et al.*, 2015). Seega on vaja faasisiirete hüpoteesi kinnitamiseks või ümberlukkamiseks täpsemaid meetodeid. Hüpoteesi toetab DHPC (1,2-diheptanoüül-*sn*-glütsero-3-fosfokoliini) analoogia pikemate ahelatega fosfokoliinidega, mille faasisiirdeid on uuritud (Kaneshina *et al.*, 2003; Matsuki *et al.*, 2003). Sel alusel võib oletada, et DHPC-l esineb 29 °C juures üks faasisiire 100 ja 200 MPa vahel. Faasisiirdeid võib esineda ka oluliselt rohkem: 1,2-dipalmitoüül-*sn*-glütsero-3-fosfatidüülkoliinil on kuus rõhust ja temperatuurist sõltuvat faasisiiret (Winter ja Dzwolak, 2005). DHPC faasisiirete uurimist komplitseerib valgu ja vesikeskkonna mõju faasiüleminekutele ja *vice versa* (Zein ja Winter, 2000). Seega on tegu kompleksse probleemiga, mis vajab tulevikus põhjalikku uurimistööd.

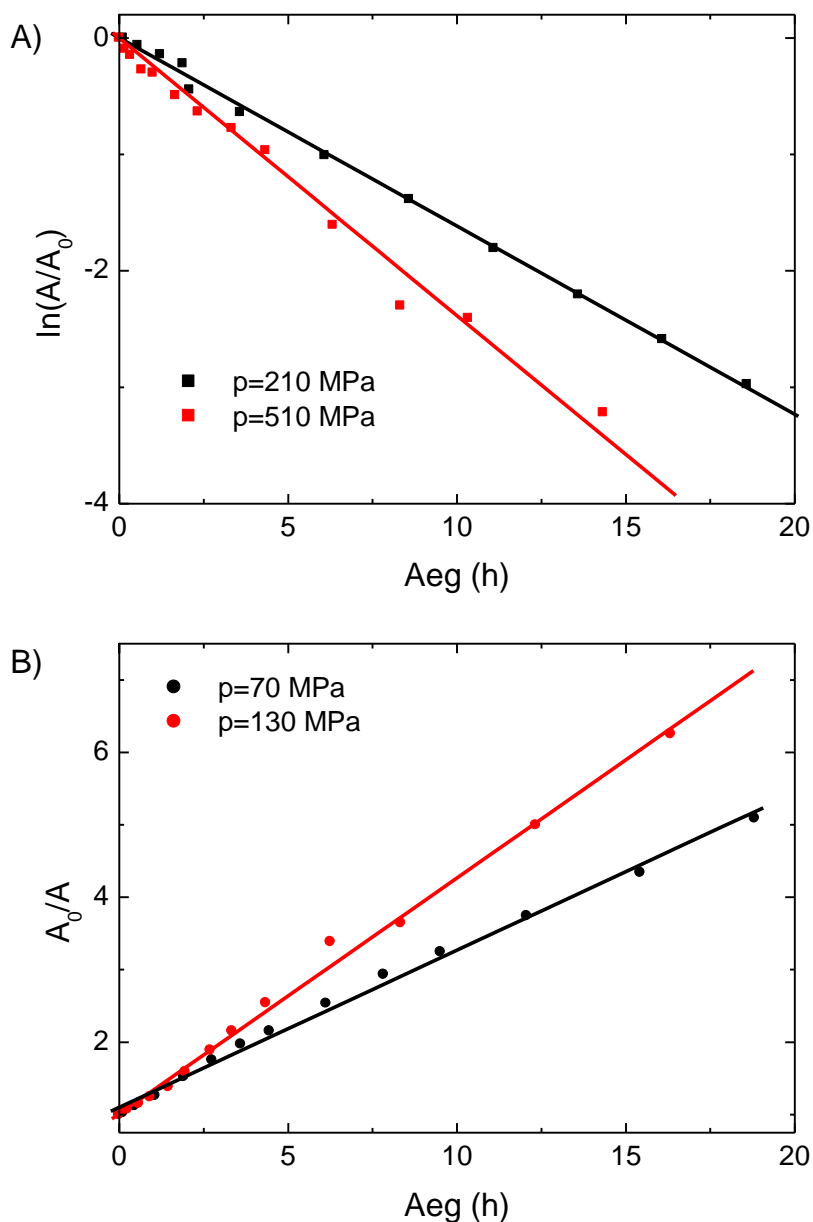
## 5.2 Reaktsiooni järk

Eelmises alapeatükis tehtud hüpoteesi erinevate LH1 dissotsiatsiooni mehhanismide kohta kinnitab reaktsiooni järgu uurimine.

Kõrgetel rõhkudel (~200–500 MPa) toimub dissotsiatsioon pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismi järgi, kuna naturaallogaritm skaalas on B875 suhteline pindala (mis on võrdeline kontsentratsiooniga) ajas lineaarne (vt joonis 21A). Tegu on just pseudo-I järku reaktsiooniga ja mitte I järku reaktsiooniga, kuna reaktsioonis osaleb tegelikult mitte üks lähteaine, vaid kaks lähteainet (LH1 ja detergent DHPC), millest ühe (DHPC) kontsentratsioon on nii suures liias, et see ei avalda reaktsiooni kiirusele mõju. Eespool (vt peatükk 4.2.1) näidati, et kõrgel rõhul toimival dissotsiatsioonil esineb isobestiline punkt, mis viitab sellele, et reaktsiooni tetrameerse vaheprodukti kontsentratsioon on minimaalne.

Arvestades *Rb. sphaeroides*'e LH1 ekstinktsioonikoefitsienti  $\varepsilon=118 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ühe bakterklorofüllü kohta (Sturgis *et al.*, 1988) ja kasutades Beer-Lamberti seadust, leiti, et LH1 kontsentratsioon proovis on 1,49  $\mu\text{M}$  (Puusepp, 2013). Arvestades DHPC 13 mM kontsentratsiooni, on detergendi ja B825 molekulide suhe ligikaudu 550:1. Vähemalt kõrgetel rõhkudel on see suhe piisav, et dissotsieerunud LH1 hüdrofoobsed pinnad detergendi molekulide poolt täielikult katta. Võrdluseks, Wang *et al.* (2003) on näidanud, et ühe *Rs. rubrum*'i B820 subühiku ümber on normaalarõhul suurusjärgus 100 *n*-oktüül- $\beta$ -D-glükopüranosiidi molekuli.





**Joonis 21. A) B875 riba suhtelise pindala (kontsentratsiooni) naturaallogaritmide sõltuvus ajast ~200–500 MPa juures. B) B875 suhtelise pindala (kontsentratsiooni) pöördväärtuse sõltuvus ajast rõhkudel ~50–200 MPa. Joonistel on selguse huvides toodud vaid piirrõhkude sõltuvused.**

Keskistel rõhkudel (~50–200 MPa) toimub LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks II järku reaktsiooni mehhanismi järgi (vt joonis 21B), mida iseloomustab B875 suhtelise kontsentratsiooni (pindala) pöördvõrdelisus ajast. Seega võib arvata, et keskmistel rõhkudel

sõltub LH1 dissotsiatsiooni kiirus kahe lähteaine (LH1 ja DHPC) kontsentratsioonist. Huvitaval kombel järgib ka RC-LH1-PufX kompleksi dissotsiatsioon kõrge rõhu all II järku reaktsiooni kineetikat, seda nii 13 kui 22 mM DHPC-ga proovis vastavalt 210 ja 340 MPa juures (tulemusi ei ole näidatud).

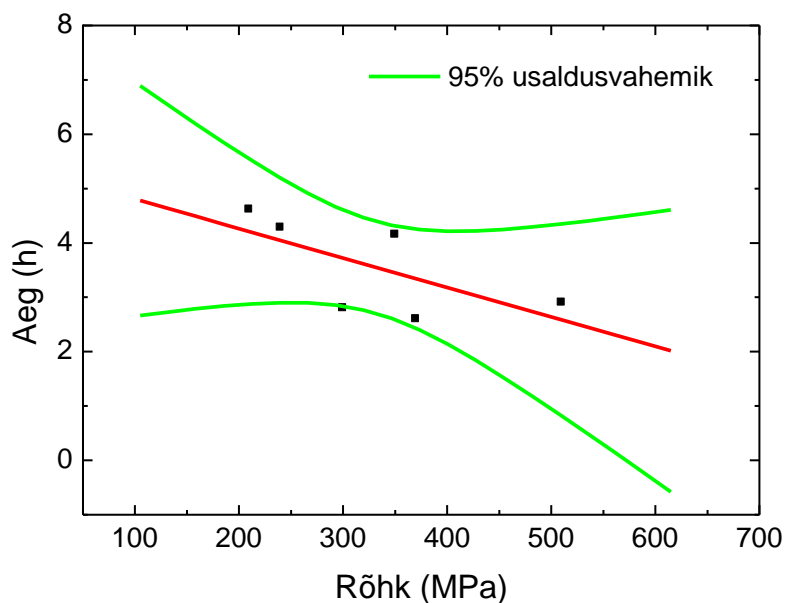
Madalatel rõhkudel (<50 MPa) ja väga kõrgetel rõhkudel (>500 MPa) ei ole dissotsiatsiooni võimalik kirjeldada ei pseudo-I ega II järku mehhanismi kaudu, mis viitab sellele, et tegu on oluliselt keerukamate reaktsioonidega, mille kirjeldamiseks oleks vaja kasutada kõrgemat järku mitmeastmelisi reaktsioone. Kõrgemat järku reaktsioonide uurimine on aga äärmiselt komplitseeritud ja jääb väljapoole käesoleva töö eesmärke.

Membraanivalkude dissotsiatsiooni rõhu all on vähe uuritud. Oligomeersete tsütoplasmaatiliste valkude dissotsiatsiooni näiteks on tsäperonvalk cpn60 (Gorovits *et al.*, 1995), mis dissotsieerub 130–200 MPa all 14 monomeerseks subühikuks samuti I järku reaktsiooni mehhanismi järgi.

### 5.3 Dissotsiatsiooni kineetika

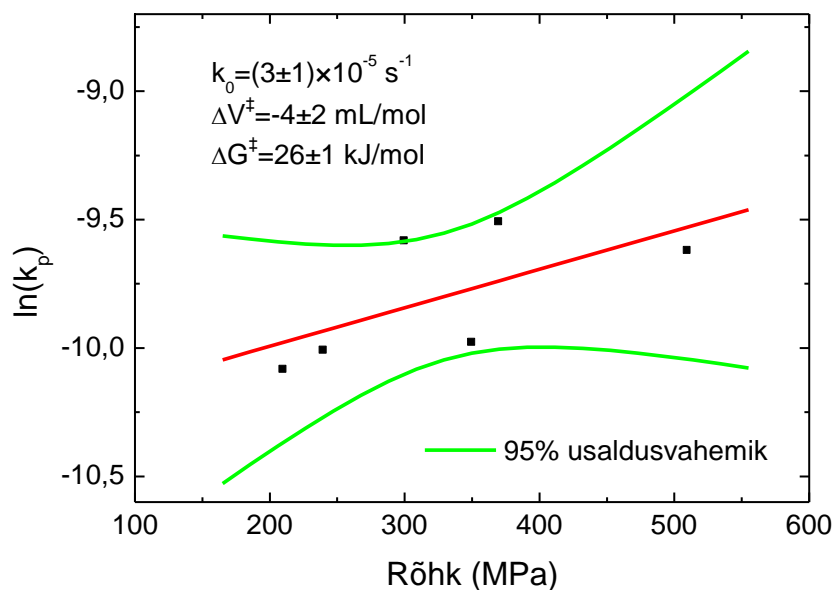
Kõrgetel rõhkudel (~200–500 MPa) toimuvat pseudo-I järku reaktsiooni võib iseloomustada kineetiliste parameetrite abil. Kuna neeldumine on võrdeline kontsentratsiooniga, on B875 riba suhtelise neeldumise abil võimalik leida rõhust sõltuvad kiiruskonstandid. Esimest järku reaktsioonide jaoks kehtib:  $A = A_0 e^{-k_p t}$ , kus  $A$  on kontsentratsioon (neeldumine) hetkel  $t$ ,  $A_0$  on kontsentratsioon (neeldumine) hetkel 0 ning  $k_p$  on rõhust sõltuv kiiruskonstant. Joonisel 21A kujutatud sirgete tõusude abil on seega võimalik leida igale rõhule vastav kiiruskonstant, kuna  $\ln(A/A_0)$  vs aeg skaalas on sirge tõus  $B$  võrdne  $-k_p$ -ga. Poolestusaeg  $\tau_{1/2}$  sõltub kiiruskonstandist:  $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_p}$ . Pseudo-I järku reaktsioonide poolestusajad on negatiivses lineaarses sõltuvuses rõhust ning jäävad vahemikku 4,6–2,1 tundi (vt joonis 22).

Termodünaamikast tulenevalt (Freiberg *et al.*, 2012) on kiiruskonstandi ja rõhu vahel seos:  $-RT \ln(k_p) = \Delta G^\ddagger + \Delta V^\ddagger p$ , kus  $T$  on temperatuur Kelvinites,  $R$  on universaalne gaasikonstant (8,3145 J/(mol·K)),  $\Delta G^\ddagger$  on aktivatsiooni vaba energia,  $\Delta V^\ddagger$  on aktivatsiooniruumala ning  $p$  on rõhk.



**Joonis 22.** Intaktse LH1 poolestusaja sõltuvus rõhust pseudo-I järku reaktsioonides ~200–500 MPa juures. Lineaarne lähendus on märgitud punase joonega.

Kiiruskonstandi naturaallogaritmide sõltuvus rõhust on lineaarne (vt joonis 23). Sirge tõusu  $B$  abil on võimalik leida aktivatsiooniruumala:  $\Delta V^\ddagger = -BRT = -4 \pm 2 \frac{\text{mL}}{\text{mol}}$  (Puusepp *et al.*, 2015). Aktivatsiooniruumala  $\Delta V^\ddagger$  on reaktsiooni vaheühendi ja lähteainete osaliste molaarruumalade vahe. See iseloomustab reaktsiooni kiiruskonstandi muutumist rõhu all: negatiivne  $\Delta V^\ddagger$  näitab, et dissotsiatsioon kiireneb rõhu toimetel. Negatiivne aktivatsiooniruumala on seega kooskõlas poolestusaja lühenemisega rõhu kasvades (vt joonis 22). Di- ja tertameersete vesilahustuvate valkude dissotsiatsiooni aktivatsiooniruumalad on vahemikus -50...-200 mL/mol (Silva ja Weber, 1993). Nt glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi dissotsiatsiooni aktivatsiooniruumala on -60 mL/mol (Schmid *et al.*, 1975). Teatavaks analoogiks dissotsiatsioonile on ka valkude lahtipakkumine rõhu all: Winter ja Dzwolak (2005) leidsid, et monomeerse bakteriaalse nukleaasi aktivatsiooniruumala on -23 mL/mol.



**Joonis 23.** Kiiruskonstandi naturaallõgaritmi sõltuvus rõhust ~200–500 MPa juures (Puusepp *et al.*, 2015). Joonisel on märgitud pseudo-I järku reaktsiooni iseloomustavate parameetrite (näiv kiiruskonstant normaalarõhul  $k_0$ , aktivatsiooniruumala  $\Delta V^\ddagger$  ja aktivatsiooni vaba energia  $\Delta G^\ddagger$ ) väärtused. Lineaarne lähendus on tähistatud punase joonega.

Sirge vabaliige  $A$  võimaldab leida aktivatsiooni vaba energia  $\Delta G^\ddagger = -ART = 26 \pm 1 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  (Puusepp *et al.*, 2015). Aktivatsiooni vaba energia tähistab reaktsiooni toimumist takistava energeetilise barjääri kõrgust. See on energiahulk, mis peab olema ühel moolil lähteainel, et ületada kõrgema energiaga vaheühendi poolt tekitatud barjäär reaktsiooni toimumisele. Valkude tüüpilised aktivatsiooni vaba energia väärtused dissotsiatsioonil jäävad vahemikku 20–80 kJ/mol (Horton ja Lewis, 1992).

Kasutades kiiruskonstandi ja rõhu seost kujul  $k_p = k_0 e^{\frac{-\Delta V^\ddagger p}{RT}}$ , leiti näiv kiiruskonstant normaalarõhul:  $k_0 = e^A = 3 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  (Puusepp *et al.*, 2015).  $k_0$  väärtus on näiv, kuna normaalarõhul ei toimu dissotsiatsioon sama mehhanismi järgi kui ~200–500 MPa vahemikus.

Kõigi nimetatud parameetrite juures tuleb meeles pidada, et need iseloomustavad LH1 dissotsiatsiooni pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismi järgi ~200–500 MPa rõhu all.

## Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös uuritakse *Rb. sphaeroides*'e oligomeerse valgust neelava kompleksi LH1 dissotsiatsiooni kõrge hüdrostaatilise rõhu ja detergendi toimel. LH1 struktuurse oleku iseloomustamiseks kasutati natiivsete pigmentidega (bakterklorofüll a ja karotenoidid) ning valgu kromofooridega (peptiidsidemed, aromaatsed aminohappejäägid, jne) seotud optilisi signaale, mõõtes nende neeldumis- ja kiirgusspektreid ning optilist dikroismi (CD).

Tulemused näitavad, et nii ringikujuline LH1 ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ) kui ka natiivne RC-LH1-PufX ( $\text{RC}_2\alpha_{28}\beta_{28}\text{BChl}_{56}\text{PufX}_2$ ) kompleks dissotsieeruvad kõrge hüdrostaatilise rõhu ja detergendi DHPC mõjul heterodimeerseteks subühikuteks B825 ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ). Dissotsiatsiooni jälgiti nii neeldumis- kui kiirgusspektrite vahendusel. Rõhu langetamisel toimub heterodimeeride osaline assotsiatsioon tagasi tervikkompleksiks B875.

Dissotsiatsiooni käigus kaotab karotenoid oma optilise aktiivsuse, mis viitab molekulidevahelise eksitonsideme katkemisele, molekuli konformatsiooni muutusele ja karotenoidi vabanemisele. LH1 denatureerimisel kõrge detergendi kontsentratsiooniga degradeeruvad ka LH1 valgulise osa sekundaarstruktuurile iseloomulikud  $\alpha$ -heeliksid ning valgu tertsiaarstruktuur.

LH1 bakterklorofüllil neeldumise piirkonnas jälgitud dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust.

- Madalal rõhul (<50 MPa) dissotsieerub LH1 ring heterodimeerideks, kuid vähesel määral tekib ka monomeere. Dissotsiatsioon muutub madalal rõhul väga aeglaseks ning selle kineetika kirjeldamiseks oleks vaja kasutada kõrgemat järku reaktsiooni mehhanisme.
- Keskmistel rõhkudel (~50–200 MPa) toimub LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks II järku reaktsiooni mehhanismi järgi, mis viitab sellele, et detergendi kontsentratsioon mõjutab reaktsiooni kiirust. Mehhanismi võib mõjutada ka vähesel määral toimuv monomeeri B777 akumulatsioon spektris. Ka natiivne RC-LH1-PufX kompleks dissotsieerub kõrge rõhu all II järku mehhanismi järgi.
- Kõrgetel rõhkudel (~200–500 MPa) dissotsieerub LH1 ring heterodimeerideks pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismi järgi, mis tähendab, et detergendi kontsentratsioon reaktsiooni kiirust ei mõjuta ning vaheprodukti akumulatsioon ei toimu. Pseudo-I järku reaktsiooni on võimalik kirjeldada kineetiliste parameetrite abil. LH1 poolestusaeg lüheneb rõhu kasvades lineaarselt ja jääb 13 mM detergendi kontsentratsiooni korral

sõltuvalt rõhust vahemikku 4,1–2,6 tundi. Reaktsiooni aktivatsiooniruumala on seejuures  $\Delta V^\ddagger = -4 \pm 2 \frac{\text{mL}}{\text{mol}}$ . Aktivatsiooniruumala negatiivne väärtus näitab, et reaktsioon kiireneb rõhu toimetel. Aktivatsiooni vaba energia ehk reaktsiooni energeetilise barjääri kõrgus  $\Delta G^\ddagger = 26 \pm 1 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ . Dissotsiatsiooni näiv kiiruskonstant normaalarõhul  $k_0 = 3 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ .

- Väga kõrgetel rõhkudel (>500 MPa) ilmneb, et LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks toimub üle tetrameerse vaheühendi B845 ( $\alpha_2\beta_2\text{BChl}_4$ ), mille kontsentratsioon katse jooksul esialgu suureneb ja seejärel väheneb. Väiksemal määral akumulēerub ja seejärel kaob ka monomeer B777. Väga kõrgete rõhkude juures toimuvat LH1 dissotsiatsiooni ei ole samuti võimalik kõrgemat järku kineetika abita kirjeldada.

Üldistatult toimub LH1 dissotsiatsioon järgneva skeemi alusel:  $\text{B875} \rightleftharpoons 8 \text{ B845} \rightleftharpoons 16 \text{ B825} \rightleftharpoons 32 \text{ B777}$ . Diskreetseid erinevusi mehhanismis võivad põhjustada detergendi DHPC faasisiirded. Väga madalal rõhul, sh normaalarõhul on reaktsiooni tasakaal suunatud monomeeri B777 ( $\alpha_1\text{BChl}_1$  või  $\beta_1\text{BChl}_1$ ) tekkimisele. Kõrgetel rõhkudel aga assotsieeruvad monomeerid tagasi heterodimeerideks. LH1 dissotsiatsiooni kiirust piiravaks etapiks võib sõltuvalt rõhust olla B875 dissotsiatsioon tetrameeriks (~200–500 MPa juures), tetrameeri dissotsiatsioon heterodimeerideks (>500 MPa juures) või B825 dissotsiatsioon monomeerideks (normaalarõhul).

Autor soovib edaspidi ühildada CD-spektromeetria ja kõrge rõhu spektroskoopia, et uurida fotosünteesiliste komplekside dissotsiatsiooni ja denaturatsiooni käigus toimuvaid struktuurseid ja konformatsioonilisi muutusi kõrge rõhu all molekulide optilise aktiivsuse mõõtmise abil.

Kõrge rõhu uuringute tulemuste põhjal valmis magistritöö autori ja juhendajate koostöös artikkel, mis ilmus ajakirjas High Pressure Research (Puusepp *et al.*, 2015; vt lisa 2). Magistritöö autor tutvustas artikli tulemusi suulise ettekandega Euroopa Kõrge Rõhu Uuringute Töögrupi konverentsil Lyonis septembris 2014 (Puusepp *et al.*, 2014a). Tulemusi demonstreeriti ka stendiettekandes Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi iga-aastaselt konverentsil detsembris 2014 (Puusepp *et al.*, 2014b).

## **Tänuavaldused**

Autor soovib ennekõike tänada oma suurepäraseid ja abivalmis juhendajaid dr Liina Kangurit ja professor Arvi Freibergi. Lisaks kuulub tänu dr Margus Rätsepale spektroskoopiaalaste näpunäidete ja Hain Salujärvele mitmekülgse tehnilise toe eest. Proovide valmistamise ja puhastamise eest tänab autor C. N. Hunteri töörühma Sheffieldi Ülikoolist.

Autor tänab ka oma elukaaslast ja vanemaid, kes on seniseid õpinguid igati toetanud.

Käesoleva uurimistöö valmimist toetas Eesti Teadusagentuur IUT02-28 grandi kaudu. Autori osalemist Euroopa Kõrge Rõhu Uuringute Töögrupi konverentsil toetasid Haridus- ja Teadusministeerium ning SA Archimedes.

# **A barospectroscopic study of oligomeric membrane proteins of photosynthetic origin**

Marit Puusepp

## **Summary**

*Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* is a photosynthetic purple bacterium. The photosynthetic apparatus of purple bacteria is much simpler than that of plants, making them ideal models for studying photosynthesis. A key component of photosynthesis in purple bacteria is the Light-Harvesting Complex I (LH1). Light-Harvesting Complexes contain pigment molecules (bacteriochlorophyll and carotenoids) which absorb light and transfer the excitonic energy to the Reaction Centre (RC), where electromagnetic energy is turned into chemical bond energy (van Amerongen *et al.*, 2000).

LH1 is an oligomeric integral membrane protein. The basic subunit of LH1 is a heterodimer of bacteriochlorophyll a (BChl) and  $\alpha\beta$ -apoproteins ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ) (Zuber, 1985). The ring-shaped LH1 complex is a hexadecamer ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{BChl}_{32}$ ) of heterodimers (Hu ja Schulten, 1998).

Applying pressure to macromolecules allows studying their stability and may help solve problems in fields as varied as the origin of life (Trevors, 2002), astrobiology (Jakosky ja Shock, 1998), a cure for Alzheimer's disease (Randolph *et al.*, 2002) and food technology (Swientek, 1992). Pressure induced dissociation of oligomeric membrane proteins is a novel topic. Souza *et al.* (2004) have studied the pressure-induced dissociation of ATP synthase and Linke *et al.* (2008) have studied the dissociation of dimeric ToxR protein.

The aim of the current master's thesis is to study the pressure and detergent dependent dissociation of the integral membrane protein LH1 using optical spectroscopy. Microscopic rubies were used to determine pressure in a Diamond Anvil Cell. Optical signals related to the pigments and protein chromophores of LH1 and the native RC-LH1-PufX were measured via absorption, fluorescence and CD-spectra in order to study structural changes in the complexes.

Both LH1 and RC-LH1-PufX complex (spectroscopic indication B875 after their peak absorption wavelength in near-infrared) dissociated into heterodimeric subunits B825 ( $\alpha_1\beta_1\text{BChl}_2$ ) under



high hydrostatic pressure and 13 mM DHPC concentration. Lowering the pressure after high pressure induced dissociation, resulted in the partial re-association of LH1.

The carotenoid loses its optical activity during LH1 dissociation. This may be caused by conformational changes, solubilisation and the disruption of excitonic bonds between molecules. High detergent concentrations (up to 200 mM DHPC) denature the tertiary and  $\alpha$ -helical secondary structures of the LH1 protein.

The mechanism of LH1 dissociation (followed in the near-infrared region) depends on pressure.

- At low pressures (<50 MPa) LH1 dissociates into heterodimeric subunits, and (to a small amount) monomeric subunits. The reaction is complex and requires higher order kinetics to analyse thoroughly.
- At medium pressures (~50–200 MPa) LH1 dissociation into heterodimers follows second order kinetics. This implies that the concentration of the detergent influences the reaction rate. The monomer is also more strongly present than in higher pressure spectra. The native RC-LH1-PufX complex also dissociates according to the II order mechanism.
- At high pressures (~200–500 MPa) LH1 dissociates into 16 heterodimers following pseudo-I order kinetics. At this pressure range the dissociation takes place in its simplest form and does not appear to be influenced by detergent concentration or intermediates. The pseudo-I order reaction is characterized by kinetic parameters: activation volume  $\Delta V^\ddagger = -4 \pm 2 \frac{\text{mL}}{\text{mol}}$ , free energy of activation  $\Delta G^\ddagger = 26 \pm 1 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  and the apparent reaction rate at atmospheric pressure  $k_0 = 3 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ . The half-life of LH1 decreases linearly with pressure and is in the range of 4,1–2,6 hours depending on pressure.
- At very high pressures (>500 MPa) dissociation is complex due to the accumulation of a tetrameric ( $\alpha_2\beta_2\text{BChl}_4$ ) intermediate B845.

In general, the dissociation of LH1 follows the scheme:  $\text{B875} \rightleftharpoons 8 \text{ B845} \rightleftharpoons 16 \text{ B825} \rightleftharpoons 32 \text{ B777}$ . Discrete differences in mechanism may be explained by phase transitions of the detergent DHPC. At very low pressures (including atmospheric pressure) heterodimers dissociate further into monomeric subunits B777 ( $\alpha_1\text{BChl}_1$  or  $\beta_1\text{BChl}_1$ ). At high pressures monomers associate to form heterodimers. The rate limiting factor of the dissociation process may be the first step of the dissociation (at ~200–500 MPa), the second step (at pressures >500 MPa) or the third (at atmospheric pressure).

High pressure spectroscopy results have been published in High Pressure Research (Puusepp *et al.*, 2015) and presented at conferences (Puusepp *et al.*, 2014a; Puusepp *et al.*, 2014b). Future work should combine high pressure and CD-spectroscopy in order to study the pressure and detergent dependent dissociation and denaturation processes in photosynthetic pigment-protein complexes via changes in the optical activity of the molecules.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- Abdul-Gader, A., Miles, A. J. and Wallace, B. A. (2011). A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinformatics*. 27: 1630-1636.
- Adams, P. G. and Hunter, C. N. (2012). Adaptation of intracytoplasmic membranes to altered light intensity in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1817: 1616-1627.
- Arluison, V., Seguin, J. and Robert, B. (2002). The reaction order of the dissociation reaction of the B820 subunit of *Rhodospirillum rubrum* light-harvesting I complex. *FEBS Lett*. 516: 40-42.
- Bahatyrova, S., Frese, R. N., van der Werf, K. O., Otto, C., Hunter, C. N. and Olsen, J. D. (2004). Flexibility and size heterogeneity of the LH1 light harvesting complex revealed by atomic force microscopy: functional significance for bacterial photosynthesis. *J. Biol. Chem*. 279: 21327-21333.
- Ballard, R. D. (1977). Notes on a major oceanographic find (marine animals near hot-water vents at ocean bottom). *Oceanus*. 20: 35-44.
- Bartlett, D. H. (2002). Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1595: 367-381.
- Blankenship, R., Madigan, M. and Bauer, C. 1995. Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. and Clark, D. S. (2002). Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1595: 235-249.
- Braun, P., Gebhardt, R., Kwa, L. and Doster, W. (2005). High pressure near infrared study of the mutated light-harvesting complex LH2. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 38: 1273-1278.
- Campbell, I. D. and Dwek, R. A. 1984. Biological spectroscopy. Benjamin/Cummings Pub. Co.
- Chang, M. C., Meyer, L. and Loach, P. A. (1990). Isolation and characterization of a structural subunit from the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 and puc705-BA. *Photochem. Photobiol*. 52: 873-881.

- Cogdell, R. J., Gall, A. and Kohler, J. (2006). The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes. *Q. Rev. Biophys.* 39: 227-324.
- Compton, L. A. and Johnson, W. C., Jr. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155: 155-167.
- Connell, J. J. (1958). Studies on the proteins of fish skeletal muscle. 5. Molecular weight and shape of cod fibrillar proteins. *Biochem. J.* 70: 81-91.
- Daniel, I., Oger, P. and Winter, R. (2006). Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem. Soc. Rev.* 35: 858-875.
- Emerson, R. and Arnold, W. (1932). The photochemical reaction in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* 16: 191-205.
- Erauso, G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B., Partensky, F. . . . and Prieur, D. (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 160: 338-349.
- Freiberg, A. 1995. Coupling of antennas to reaction centers, p. 385-398. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (ed.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Freiberg, A., Ellervee, A., Kukk, P., Laisaar, A., Tars, M. and Timpmann, K. (1993). Pressure effects on spectra of photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes. *Chem. Phys. Lett.* 214: 10-16.
- Freiberg, A., Kangur, L., Olsen, J. D. and Hunter, C. N. (2012). Structural Implications of Hydrogen-Bond Energetics in Membrane Proteins Revealed by High-Pressure Spectroscopy. *Biophys. J.* 103: 2352-2360.
- Freiberg, A. and Trinkunas, G. 2009. Unraveling the Hidden Nature of Antenna Excitations, p. 55-82. *In* A. Laisk, L. Nedbal and Govindjee (ed.), *Photosynthesis in silico*, vol. 29. Springer, The Netherlands.

- Förster, T. 1965. Delocalization exciton and excitation transfer, p. 93-137. *In* O. Sinanoglu (ed.), *Modern Quantum Chemistry*, vol. III. Academic Press, New York.
- Gall, A., Ellervee, A., Sturgis, J. N., Fraser, N. J., Cogdell, R. J., Freiberg, A. and Robert, B. (2003). Membrane Protein Stability: High Pressure Effects on the Structure and Chromophore-Binding Properties of the Light-Harvesting Complex LH2. *Biochemistry*. 42: 13019-13026.
- Garavito, R. M. and Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J. Biol. Chem.* 276: 32403-32406.
- German, B., Damodaran, S. and Kinsella, J. E. (1982). Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* 30: 807-811.
- Gorovits, B., Raman, C. S. and Horowitz, P. M. (1995). High hydrostatic pressure induces the dissociation of cpn60 tetradecamers and reveals a plasticity of the monomers. *J. Biol. Chem.* 270: 2061-2066.
- Gottstein, J., Scherz, A. and Scheer, H. (1993). Bacteriochlorophyll aggregates in positively charged micelles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1183: 413-416.
- Grasset, O. (2001). Calibration of the R ruby fluorescence lines in the pressure range [0-1 GPa] and the temperature range [250-300 K]. *High Pressure Res.* 21: 139-157.
- Greenfield, N. J. and Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*. 8: 4108-4116.
- Hauser, H. (2000). Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 164-181.
- Horton, N. and Lewis, M. (1992). Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Sci.* 1: 169-181.
- Hoyle, F. and Wickramasinghe, C. 1981. *Evolution from space*. Dent, London.
- Hu, X., Ritz, T., Damjanovic, A., Autenrieth, F. and Schulten, K. (2002). Photosynthetic apparatus of purple bacteria. *Q. Rev. Biophys.* 35: 1-62.
- Hu, X. and Schulten, K. (1998). Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 75: 683-694.

Jakosky, B. M. and Shock, E. L. (1998). The biological potential of Mars, the early Earth, and Europa. *J. Geophys. Res. (Planets)*. 103: 19359-19364.

Johnson, F. H. and Zobell, C. E. (1949). The acceleration of spore disinfection by urethan and its retardation by hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* 57: 359-362.

Jones, M. R., Fowler, G. J., Gibson, L. C., Grief, G. G., Olsen, J. D., Crielaard, W. and Hunter, C. N. (1992). Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes. *Mol. Microbiol.* 6: 1173-1184.

Jungas, C., Ranck, J.-L., Rigaud, J.-L., Joliot, P. and Verméglio, A. (1999). Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.* 18: 534-542.

Kaneshina, S., Matsuki, H., Kusube, M. and Ichimori, H. 2003. Effects of Cis and Trans Unsaturation on the Barotropic and Thermotropic Phase Behavior of Phospholipid Bilayers, p. 195-198. *In* R. Winter (ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, vol. II. Springer, Berlin.

Kangur, L. (2013). High-pressure spectroscopy study of chromophore-binding hydrogen bonds in light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria. PhD, University of Tartu, Tartu. Downloaded from <http://hdl.handle.net/10062/31584>.

Kangur, L., Leiger, K. and Freiberg, A. (2008a). Evidence for high-pressure-induced rupture of hydrogen bonds in LH2 photosynthetic antenna pigment-protein complexes. *Journal of Physics: Conference Series*. 121: 112004.

Kangur, L., Timpmann, K. and Freiberg, A. (2008b). Stability of integral membrane proteins under high hydrostatic pressure: the LH2 and LH3 antenna pigment-protein complexes from photosynthetic bacteria. *J. Phys. Chem. B.* 112: 7948-7955.

Kato, M., Hayashi, R., Tsuda, T. and Taniguchi, K. (2002). High pressure-induced changes of biological membrane. *Eur. J. Biochem.* 269: 110-118.

Kawasaki, T. and Ashwell, G. (1976). Chemical and physical properties of an hepatic membrane protein that specifically binds asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 251: 1296-1302.

- Kharakoz, D. P. (2000). Protein Compressibility, Dynamics, and Pressure. *Biophys. J.* 79: 511-525.
- Kiley, P. J., Donohue, T. J., Havelka, W. A. and Kaplan, S. (1987). DNA sequence and *in vitro* expression of the B875 light-harvesting polypeptides of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 169: 742-750.
- Klapper, M. H. and Klotz, I. M. (1968). Cooperative interactions and determination of protein association-dissociation equilibria. Hemerythrin. *Biochemistry.* 7: 223-231.
- Langerman, N. R. and Klotz, I. M. (1969). Free energy of subunit interactions. Hemerythrin. *Biochemistry.* 8: 4746-4752.
- le Maire, M., Champeil, P. and Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 86-111.
- Linke, K., Periasamy, N., Ehrmann, M., Winter, R. and Vogel, R. F. (2008). Influence of high pressure on the dimerization of ToxR, a protein involved in bacterial signal transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7821-7823.
- Loach, P. A., Parkes, P. S., Miller, J. F., Hinchigeri, S. and Callahan, P. M. (1985). Structure-function relationships of the bacteriochlorophyll-protein light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum*. Paper presented at the Cold Spring Harbor Symposium on Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus, Cold Spring Harbor, NY.
- Makhneva, Z. K., Erokhin, Y. E. and Moskalenko, A. A. (2007). Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800-850 in *Allochromatium minutissimum* cells. *Dokl. Biochem. Biophys.* 416: 256-259.
- Manavalan, P. and Johnson, W. C., Jr. (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 167: 76-85.
- Matsuki, H., Kusube, M., Hata, T. and Kaneshina, S. 2003. Barotropic and Thermotropic Phase Behavior of Bilayer Membranes Composed of Phospholipids Containing Cis Double Bond in the sn-2 Acyl Chain, p. 199-202. *In* R. Winter (ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, vol. II. Springer, Berlin.

- Mauzerall, D. and Greenbaum, N. L. (1989). The absolute size of a photosynthetic unit. *Biochim. Biophys. Acta.* 974: 119-140.
- Neuman, R. C., Kauzmann, W. and Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.* 77: 2687-2691.
- Niwa, S., Yu, L.-J., Takeda, K., Hirano, Y., Kawakami, T., Wang-Otomo, Z.-Y. and Miki, K. (2014). Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature.* 508: 228-232.
- Oger, P. M. and Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Res. Microbiol.* 161: 799-809.
- Pandit, A., Visschers, R. W., van Stokkum, I. H. M., Kraayenhof, R. and van Grondelle, R. (2001). Oligomerization of Light-Harvesting I Antenna Peptides of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry.* 40: 12913-12924.
- Parkes-Loach, P., Riccobono, J. and Loach, P. 1987. Preparation of Subunit Forms of the Light-Harvesting Complex of *Rhodospirillum rubrum*, p. 25-28. *In* J. Biggins (ed.), *Progress in Photosynthesis Research*. Springer, Netherlands.
- Parkes-Loach, P. S., Majeed, A. P., Law, C. J. and Loach, P. A. (2004). Interactions stabilizing the structure of the core light-harvesting complex (LH1) of photosynthetic bacteria and its subunit (B820). *Biochemistry.* 43: 7003-7016.
- Parson, W. W. 2007. *Modern Optical Spectroscopy*. S. Schreck (ed.). Springer, Heidelberg.
- Penniston, J. T. (1971). High hydrostatic pressure and enzymic activity: Inhibition of multimeric enzymes by dissociation. *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 322-332.
- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria, p. 3-18. *In* R. K. Clayton and W. R. Sistrom (ed.), *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Prieur, D. and Marteinsson, V. 1998. Prokaryotes living under elevated hydrostatic pressure, p. 23-35. *In* G. Antranikian (ed.), *Biotechnology of Extremophiles*, vol. 61. Springer, Berlin.



Privé, G. G. (2007). Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*. 41: 388-397.

Pullerits, T. and Sundström, V. (1996). Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: toward understanding how and why. *Acc. Chem. Res.* 29: 381-389.

Puusepp, M. (2013). *Rhodobacter sphaeroides*'e oligomeerse valgust neelava kompleksi LH1 dissotsiatsioon kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel. Bachelor's Thesis, University of Tartu, Tartu. Downloaded from <http://dspace.utlib.ee/dspace/handle/10062/30837>. Retrieved from University of Tartu DSpace database.

Puusepp, M., Kangur, L. and Freiberg, A. (2014a, 07.09.2014-12.09.2014). Pressure induced dissociation of the oligomeric membrane protein complex LH1 from *Rhodobacter sphaeroides*. Paper presented at the 52nd European High Pressure Research Group International Meeting, Lyon, France.

Puusepp, M., Kangur, L. and Freiberg, A. (2014b, 15.-16.12.2014). Pressure induced dissociation of the oligomeric membrane protein complex LH1 from *Rhodobacter sphaeroides*. Paper presented at the Institute of Molecular and Cell Biology, Estonian Genome Centre and Estonian Biocentre Annual Conference, Tartu, Estonia.

Puusepp, M., Kangur, L. and Freiberg, A. (2015). Dissociation of the light-harvesting membrane protein complex I from *Rhodobacter sphaeroides* under high hydrostatic pressure. *High Pressure Res.* 35: 176-180.

Qian, P., Hunter, C. N. and Bullough, P. A. (2005). The 8.5 Å Projection Structure of the Core RC-LH1-PufX Dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Mol. Biol.* 349: 948-960.

Qian, P., Papiz, M. Z., Jackson, P. J., Brindley, A. A., Ng, I. W., Olsen, J. D. . . . and Hunter, C. N. (2013). Three-Dimensional Structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX Complex: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Biochemistry*. 52: 7575-7585.

Ralston, G., Dunbar, J. and White, M. (1977). The temperature-dependent dissociation of spectrin. *Biochim. Biophys. Acta*. 491: 345-348.

Randolph, T. W., Seefeldt, M. and Carpenter, J. F. (2002). High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1595: 224-234.

- Roth, M., Arnoux, B., Ducruix, A. and Reiss-Husson, F. (1991). Structure of the detergent phase and protein-detergent interactions in crystals of the wild-type (strain Y) *Rhodobacter sphaeroides* photochemical reaction center. *Biochemistry*. 30: 9403-9413.
- Schmid, G., Lüdemann, H. D. and Jaenicke, R. (1975). High pressure effects on the activity of glycolytic enzymes. *Biophys. Chem.* 3: 90-98.
- Seddon, A. M., Curnow, P. and Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta*. 1666: 105-117.
- Shneour, E. A. (1962). Carotenoid pigment conversion in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*. 62: 534-540.
- Silva, J. L., Silveira, C. F., Correia, A., Jr. and Pontes, L. (1992). Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer: Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor. *J. Mol. Biol.* 223: 545-555.
- Silva, J. L. and Weber, G. (1993). Pressure Stability of Proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44: 89-113.
- Souza, M. O., Creczynski-Pasa, T. B., Scofano, H. M., Gräber, P. and Mignaco, J. A. (2004). High hydrostatic pressure perturbs the interactions between CF0F1 subunits and induces a dual effect on activity. *Int. J. Biochem. Cell B.* 36: 920-930.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. and Woody, R. W. (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Anal. Biochem.* 287: 243-251.
- Sreerama, N. and Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287: 252-260.
- St. John, R. J., Carpenter, J. F. and Randolph, T. W. (1999). High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 13029-13033.

- Sturgis, J. N., Gall, A., Ellervee, A., Freiberg, A. and Robert, B. (1998). The effect of pressure on the bacteriochlorophyll a binding sites of the core antenna complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*. 37: 14875-14880.
- Sturgis, J. N., Hunter, C. N. and Niederman, R. A. (1988). Spectra and extinction coefficients of near-infrared absorption bands in membranes of *Rhodobacter sphaeroides* mutants lacking light-harvesting and reaction center complexes. *Photochem. Photobiol.* 48: 243-247.
- Sumi, H. (1999). Theory on Rates of Excitation-Energy Transfer between Molecular Aggregates through Distributed Transition Dipoles with Application to the Antenna System in Bacterial Photosynthesis. *J. Phys. Chem. B*. 103: 252-260.
- Swientek, R. (1992). High hydrostatic pressure for food preservation. *Food Process.* 53: 90-91.
- Šlouf, V., Chábera, P., Olsen, J. D., Martin, E. C., Qian, P., Hunter, C. N. and Polívka, T. (2012). Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 8570-8575.
- Zein, M. and Winter, R. (2000). Effect of temperature, pressure and lipid acyl chain length on the structure and phase behaviour of phospholipid-gramicidin bilayers. *PCCP*. 2: 4545-4551.
- Zuber, H. (1985). Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides. *Photochem. Photobiol.* 42: 821-844.
- Tars, M., Ellervee, A., Kukk, P., Laisaar, A., Saarnak, A. and Freiberg, A. (1994). Protosynthetic proteins under high pressure. *Lith. J. Phys.* 34: 320-328.
- Timpmann, K., Chenchiliyan, M., Jalviste, E., Timney, J. A., Hunter, C. N. and Freiberg, A. (2014). Efficiency of light harvesting in a photosynthetic bacterium adapted to different levels of light. *Biochim. Biophys. Acta*. 1837: 1835-1846.
- Timpmann, K., Ellervee, A., Pullerits, T., Ruus, R., Sundström, V. and Freiberg, A. (2001). Short-Range Exciton Couplings in LH2 Photosynthetic Antenna Proteins Studied by High Hydrostatic Pressure Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*. 105: 8436-8444.
- Trevors, J. T. (2002). The subsurface origin of microbial life on the Earth. *Res. Microbiol.* 153: 487-491.

- Wallin, E. and Heijne, G. V. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7: 1029-1038.
- van Amerongen, H., Valkunas, L. and Van Grondelle, R. 2000. Photosynthetic excitons. World Scientific, Singapore.
- van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. and Sundstrom, V. (1994). Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187: 1-65.
- Wang, Z.-Y., Muraoka, Y., Nagao, M., Shibayama, M., Kobayashi, M. and Nozawa, T. (2003). Determination of the B820 Subunit Size of a Bacterial Core Light-Harvesting Complex by Small-Angle Neutron Scattering. *Biochemistry.* 42: 11555-11560.
- Végh, A. P. and Robert, B. (2002). Spectroscopic characterisation of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 528: 222-226.
- Welch, T. J. and Bartlett, D. H. (1998). Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Mol. Microbiol.* 27: 977-985.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32: 668-673.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers.* 89: 392-400.
- Winter, R. and Dzwolak, W. (2005). Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A.* 363: 537-563.
- Wu, H. M., Ratsep, M., Jankowiak, R., Cogdell, R. J. and Small, G. J. (1997). Comparison of the LH2 Antenna Complexes of *Rhodopseudomonas acidophila* (Strain 10050) and *Rhodobacter sphaeroides* by High-Pressure Absorption, High-Pressure Hole Burning, and Temperature-Dependent Absorption Spectroscopies. *J. Phys. Chem. B.* 101: 7641-7653.

Wu, H. M., Rätsep, M., Jankowiak, R., Cogdell, R. J. and Small, G. J. (1998). Hole-Burning and Absorption Studies of the LH1 Antenna Complex of Purple Bacteria: Effects of Pressure and Temperature. *J. Phys. Chem. B.* 102: 4023-4034.

## **Kasutatud veebiaadressid**

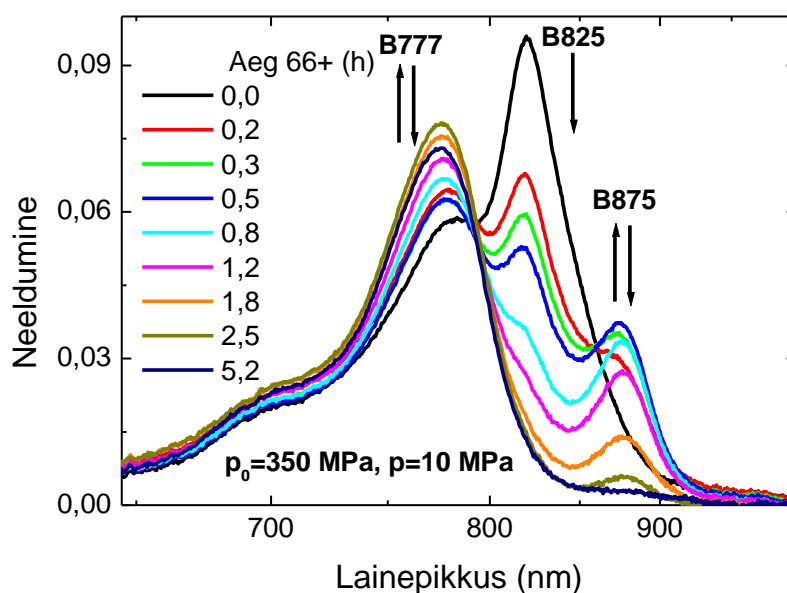
Circular Dichroism (CD) Spectroscopy: <http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>

RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

## Lisa 1: Edasist uurimist vajavad protsessid

### Lisa 1.1. LH1 pöörduv dissotsiatsioon

LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks rõhu toimetel on osaliselt pöörduv protsess. Algselt 350 MPa juures toimunud LH1 dissotsiatsioonile heterodimeerideks, järgnes rõhu langetamisel 10 MPa-le heterodimeeride osaline assotsiatsioon B875-ks (vt joonis 24). Pool tundi pärast assotsiatsiooni algust, pöördus tasakaal uuesti LH1 dissotsiatsiooni poole.



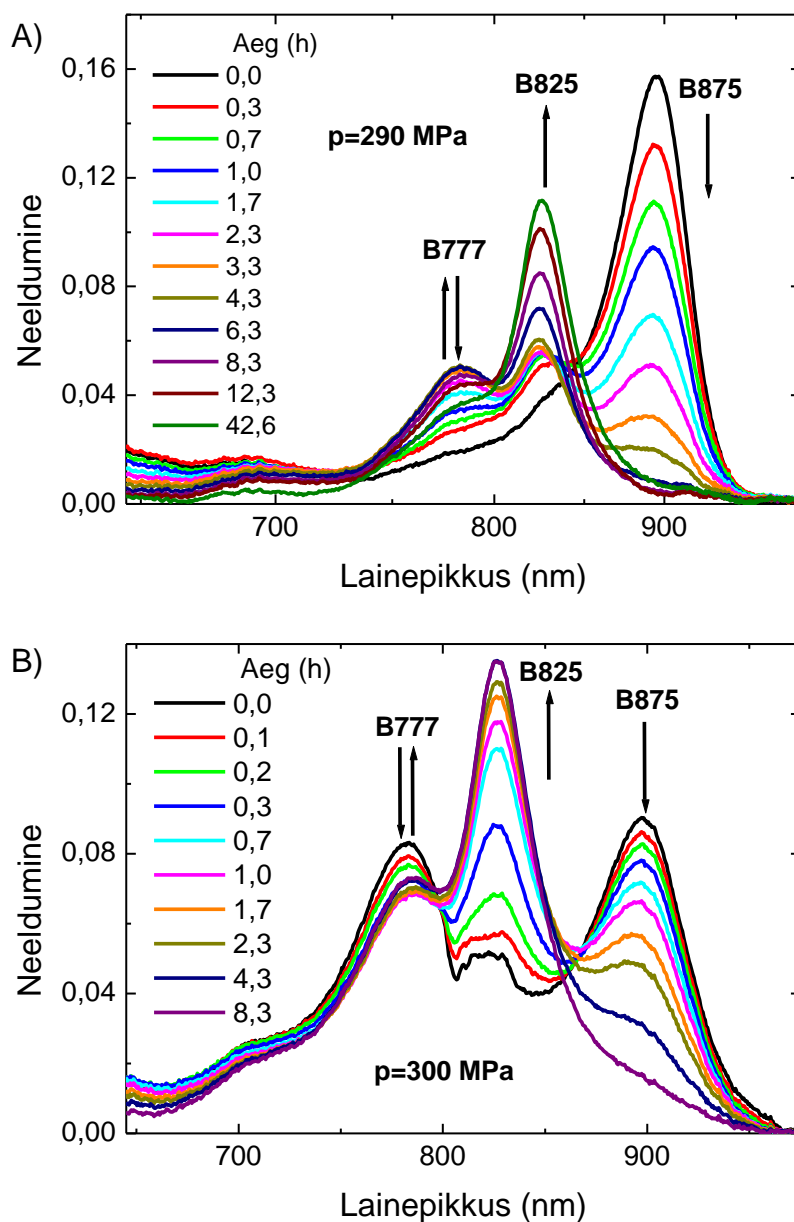
**Joonis 24. B825 assotsiatsioon B875-ks. LH1 dissotsieerus 350 MPa all heterodimeerideks. Seejärel, 66 h pärast katse algust, langetati rõhk 10 MPa-ni ja heterodimeerid hakkasid osaliselt tagasi B875-ks assotsieeruma.**

Lisaks heterodimeeride assotsiatsioonile intaktseks LH1-ks toimus väga madalal rõhul ka heterodimeeride dissotsiatsioon monomeerideks B777, mida selgitatakse peatükis 4.2.5 ja lisa 1.2.

### Lisa 1.2. Heterodimeeride pöörduv dissotsiatsioon

Lisaks heterodimeeride dissotsiatsioonile, mida kirjeldati peatükis 4.2.5, võib toimuda ka selle pöördprotsess – assotsiatsioon. Joonisel 25 on kujutatud kaht kõrgel rõhul sooritatud katset, kus juhul (A) monomeeri hulk kõigepealt kasvab veidi katse alguses (nt LH1 ebastabiilse fraktsiooni

arvel) ja seejärel kahaneb. B777 kahanemise arvelt toimub samal ajal aga heterodimeeri B825 riba kasv, mis on selge viide monomeeride assotsiatsioonile tagasi heterodimeerideks.



**Joonis 25. A) Heterodimeeri B825 pöörduv dissotsiatsioon monomeerideks B777 kõrge rõhu all. See katse toimus 10 mM DHPC kontsentratsiooni juures. B) Monomeeride B777 pöörduv assotsiatsioon heterodimeeriks B825 kõrge rõhu all 13 mM DHPC juures.**



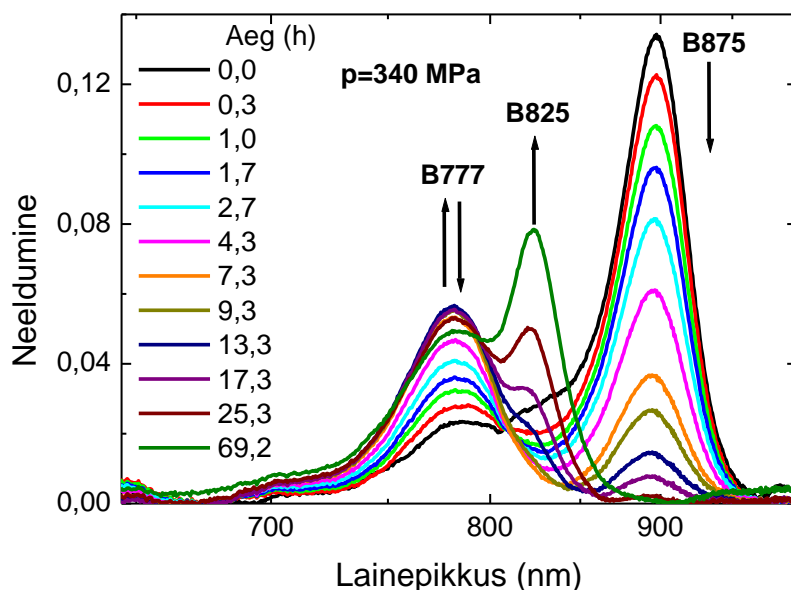
Joonis 25B näitab, kuidas võrdlemisi lagununud heterogeenses proovis, kus on tugev monomeeri neeldumisriba, toimub kõrge rõhu toimel monomeeride assotsiatsioon heterodimeerideks, katse lõpus hakkab aga B777 riba taas aeglaselt kasvama. Need tulemused viitavad sellele, et monomeeri-heterodimeeri tasakaal on väga kergesti rõhu poolt mõjutatav ning sõltub ühtlasi tugevalt proovi stabiilsusest.

### **Lisa 1.3. Hüperkromism**

LH1 dissotsiatsiooni ja assotsiatsiooni uurides on lähtutud väga põhimõttelisest biofüüsikalisest eeldusest: oligomeeri dipooljõud on tema monomeeride dipooljõudude summa (Parson, 2007). See tähendab, et eksitonpäritolu neeldumisribade summaarne spektrialune pindala katse jooksul muutuda ei tohiks. Spektrialune pindala võib tegelikult teatud määral katse jooksul kahaneda (vt peatükk 4.1). Selle põhjuseks võib olla proovi ebastabiilsete komponentide lagunemine, kusjuures laguproduktid ei jää uuritavasse spektraalsesse piirkonda.

Joonisel 26 kirjeldatud katses toimub esialgu kõrgele rõhule (340 MPa) ebatüüpiline LH1 dissotsiatsioon monomeerseks B777-ks. Seda võib ehk selgitada tavapärasest veidi kõrgem detergendi kontsentratsioon (14 mM). Kuid pärast pool ööpäeva kestnud dissotsiatsiooni algab monomeeride assotsiatsioon heterodimeerideks B825. On selge, et B825 riba intensiivsus kasvab ebaproportsionaalselt palju, võrreldes monomeeri riba minimaalse vähenemisega. Selle katse tulemus näib olevat selges vastuolus dipooljõudude jäävusega.

Tegelikult siiski ühtki jäävusseadust rikutud pole: dipooljõudude summa näilist kasvu põhjustab nähtus nimega hüperkromism (Parson, 2007). Neeldumine sõltub eksitoninteraktsioonis olevate bakterklorofüllide dipoolmomentide omavahelisest orientatsioonist. Teatud tingimustel võib seetõttu neeldumine olla oodatust intensiivsem (hüperkromism) või vastupidi (hüpokromism). Summaarne neeldumine on konstantne, sest ühe eksitonülemineku hüperkromismi kompenseerib teiste hüpokromism ja vastupidi. Aga kui eksitonülemineked ei paikne samas spektraalses piirkonnas (käesoleval juhul lähi-infrapunapiirkonnas), näib neeldumise intensiivsus katse käigus muutuvat.

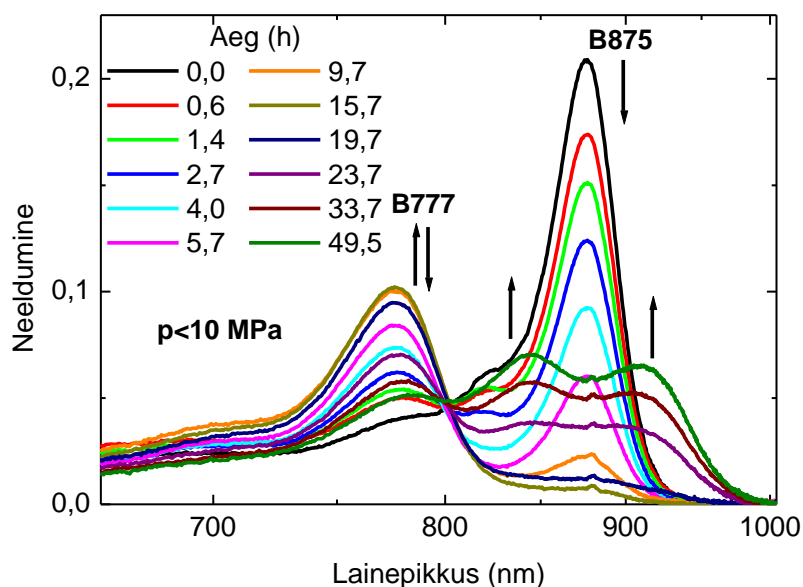


**Joonis 26. Hüperkromism monomeeride B777 assotsiatsioonil heterodimeerideks B825 kõrge rõhu all. Katse toimus 14 mM DHPC juures.**

Kuna enamikus katsetes dipooljõudude summa ei kasvanud, näib tegu olevat pigem haruldase fenomeniga, mis nõuab teatud tingimuste kokkulangemist. Kas hüperkromismi esinemine võib olla seotud kõrgema detergendi kontsentratsiooniga, jääb tulevaste uuringute selgitada.

#### **Lisa 1.4. Agregeerunud bakterklorofüll**

Minimaalse rõhu juures (<10 MPa) toimub reeglina LH1 dissotsiatsioon monomeerideks ( $\alpha_1$ BChl<sub>1</sub> või  $\beta_1$ BChl<sub>1</sub>) (vt peatükk 4.2.5). Nii juhtus ka joonisel 27 kujutatud katses 10 mM DHPC ja 20 °C juures. Kuid dissotsiatsioonile järgnes bakterklorofüllü agreggeerumine suuremateks produktideks. Agregeerumine väljendub monomeeri B777 neeldumisriba nõrgenemises ning samaaegses agreggeerunud bakterklorofüllü ribade (neeldumismaksimumidega 845 ja 910 nm piirkonnas) intensiivsuse kasvus.



**Joonis 27. Bakterklorofüllü agregeerumine. Minimaalsel rõhul (<10 MPa) dissotsieerus LH1 10 mM DHPC ja 20 °C juures monomeerideks. Monomeerid agregerusid seejärel produktideks, mis omavad neeldumismaksimume 845 ja 910 nm piirkonnas.**

Bakterklorofüllü agregeerumise põhjused on ebaselged. Võimalik, et tegu on tavapärasest madalama temperatuuri poolt põhjustatud efektiga. Ka detergendi kontsentratsioon on normist madalam. Tegu on tähelepanuväärse tulemusega, kuna ühe agregaadid neeldumise maksimumi asukoht kattub tetrameeri B845 ( $\alpha_2\beta_2\text{BChl}_4$ ) omaga. Ei ole alust arvata, et bakterklorofüllü agregeerumisel tekiks LH1 tetrameerne subühik. Tulevased tetrameeri puudutavad uuringud peaksid aga kindlasti arvestama bakterklorofüllü agregaatide tekke võimalusega samas piirkonnas. Teise agregaadid neeldumisriba maksimum on kõrgema lainepikkuse juures kui intaktsel LH1-l, sarnast agregaatid on kirjeldanud Gottstein *et al.* (1993).

## Lisa 2. Dissociation of the light-harvesting membrane protein complex I from *Rhodobacter sphaeroides* under high hydrostatic pressure

High Pressure Research, 2015  
<http://dx.doi.org/10.1080/08957959.2015.1017817>



### Dissociation of the light-harvesting membrane protein complex I from *Rhodobacter sphaeroides* under high hydrostatic pressure<sup>†</sup>

Marit Puusepp<sup>a</sup>, Liina Kangur<sup>a</sup> and Arvi Freiberg<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Physics, University of Tartu, Tartu, Estonia; <sup>b</sup>Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia

(Received 5 September 2014; final version received 17 January 2015)

The light-harvesting complex I (LH1) from *Rhodobacter sphaeroides* is an excellent model system for investigating the stability of oligomeric membrane proteins under high hydrostatic pressure. The currently investigated LH1 forms a 16-meric ring structure of B825 subunits. B825 is a heterodimer of transmembrane  $\alpha$ - and  $\beta$ -polypeptide chains, which non-covalently binds two bacteriochlorophyll  $a$  molecules. These pigment molecules were used as intrinsic spectroscopic sensors to follow the dissociation reaction. Our results demonstrate that the LH1 dissociates into B825 subunits through an intermediary tetrameric unit B845. The dissociation mechanism depends on pressure. At  $\sim 200$ – $500$  MPa the dissociation corresponds to a pseudo-first-order reaction, characterised by the apparent reaction rate at atmospheric pressure  $k_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , activation volume  $\Delta V^\ddagger = -4 \text{ mL/mol}$ , and free energy of activation  $\Delta G^\ddagger = 26 \text{ kJ/mol}$ . Below  $200$  MPa and above  $500$  MPa, the reaction is more complex, including further dissociation of B825 into monomers B777.

**Keywords:** integral membrane protein; high pressure; protein dissociation

#### Introduction

The aim of the current paper is to investigate hydrostatic pressure effects on the core light-harvesting complex I (LH1) from *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*. Pressure effects on the bacterial light-harvesting pigment–protein complexes were first studied by Freiberg et al.[1]. The LH1 is an excellent model system for investigating the stability of oligomeric membrane proteins under high hydrostatic pressure.

In wild-type organisms the LH1 complex is S-shaped,[2] consisting of 28 identical heterodimeric subunits,[3] which are conveniently named B825 after their peak absorption wavelength. The currently investigated mutant LH1 forms a closed ring and consists of 16 heterodimeric subunits. However, it has been shown that the LH1 complex may vary in size, taking arc-, polygon-, ellipse-, etc. like shapes.[4] The intact LH1 ring has an absorption peak at  $875 \text{ nm}$ , hence its spectroscopic indication as B875. The B825 subunit in *Rb. sphaeroides* corresponds to

\*Corresponding author. Email: [arvi.freiberg@ut.ee](mailto:arvi.freiberg@ut.ee)

<sup>†</sup>This paper was presented at the LIITH European High Pressure Research Group (EHPRG 52) Meeting in Lyon (France), 7–12 September 2014.

B820 in *Rhodospirillum (Rs.) rubrum* and is a heterodimer of  $\alpha$ - and  $\beta$ -transmembrane polypeptide chains, which non-covalently binds two bacteriochlorophyll *a* (BChl) molecules ( $\alpha\beta\text{Bchl}_2$ ) and one or two carotenoid molecules.[5–7] The exact number of the carotenoid molecules is still under dispute and will not be reviewed in the current paper.

The dissociation of the LH1 into B820 subunits and the following dissociation of B820 into monomeric B777 pieces ( $\alpha\text{Bchl}$  and  $\beta\text{Bchl}$ ) in *Rs. rubrum* have been shown to depend on detergent concentration [8] and temperature.[9] Dissociation of oligomeric membrane proteins under high hydrostatic pressure is a novel topic. Linke et al.[10] demonstrated the dissociation of a dimeric membrane protein ToxR from *Vibrio cholerae* under 20–50 MPa.

In the current paper, we will study the dissociation of the intact LH1 ring ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{Bchl}_{32}$ ) into smaller subunits under high hydrostatic pressure created by a diamond anvil cell (DAC) via changes in absorption and emission spectra.

## Materials and methods

The LH1 complex was purified from the membrane of the DD13/G1 mutant strain of *Rb. sphaeroides*, complemented with the plasmid borne *puf* fragment [11] using French press and sucrose-gradient centrifugation. The complex was in a 10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 3 mM 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC), pH = 7.9 buffer. The gene expression and purification were performed by the research group led by C. N. Hunter from the University of Sheffield.

A series of high pressure experiments was performed using the DAC (D-02, Diacell Products Ltd.) with a 400  $\mu\text{m}$  thick stainless steel gasket, which had an opening of 300  $\mu\text{m}$  in diameter. The cell was kept at a constant temperature of  $302.0 \pm 0.1$  K using the Haake Q/F3 80047 thermostat. Dissociation of LH1 under pressure was facilitated by the use of the detergent DHPC at 13 mM concentration. Previous work [12] has shown that below 10 mM DHPC concentration, the LH1 is stable at atmospheric pressure and ambient temperature. When preparing for the current experiments, we found that LH1 with 3 mM DHPC was perfectly stable over an eight-day experiment conducted under 300 MPa pressure and 302 K. These results highlight the need for a relatively high DHPC concentration in order to study the dissociation of LH1.

Both absorption and emission spectra were measured with a 0.3 m focal length Shamrock SR-303i Spectrograph (Andor Technology) equipped with a thermoelectrically cooled iDUS DV420A-OE CCD camera (Andor Technology). A laser diode at 635 nm was used for excitation in order to measure the emission spectra. Absorbance measurements were taken automatically every 5 min over 2–4 day measurement cycles. All spectra were measured against a reference spectrum of the buffer solution and corrected for the scattering background. In addition to the DAC experiments, one experiment was carried out in a cuvette at ambient pressure and temperature.

Microscopic spherical ruby crystals (RSA Le Rubis SA) applied for the determination of pressure in the DAC were excited at 532 nm using a Nd:YAG laser. A thermoelectrically cooled EEV30-11 CCD camera (Andor Technology) attached to a 1.5 m focal length Jobin-Yvon TH150 spectrograph measured the emission spectra of the rubies. The shift of the ruby emission band with a maximum at 694.2 nm was used to infer the pressure in the DAC. Measurement uncertainty for pressure at 95% confidence interval,  $k = 1.96$ , was found to be  $\pm 10$  MPa. This accuracy is in accordance with the results of Grasset.[13]

A detergent phase transition confirmation test was carried out using an Olympus ColorView IIIu camera attached to a microscope (Olympus IX71) with 20-fold magnification.

All data processing was performed with Microcal Origin.

## Results and discussion

The measurements performed in this work consistently show a decrease of the B875 ( $\alpha_{16}\beta_{16}\text{Bchl}_{32}$ ) absorption band and a simultaneous increase in the B825 ( $\alpha\beta\text{Bchl}_2$ ) absorption band of the detergent-isolated LH1 ring under constant hydrostatic pressure. This slow process taking place in hours has been followed over a wide pressure range from atmospheric up to 860 MPa and is interpreted as the dissociation of intact LH1 complexes into their heterodimeric subunits. The dissociation is evident through the loss of functional energy transfer of LH1 and the related emergence of the fluorescence corresponding to the B825 subunits and other dissociation products, as shown below.

As an example, Figure 1(a) depicts dissociation at 240 MPa. The sample dissociation is confirmed by the emission spectra measured initially and 4 h after constant 300 MPa pressure was applied (Figure 1(a) inset). A reference spectrum at 420 MPa pressure and 3 mM DHPC demonstrates the spectrum characteristic to fully intact LH1.

The exact dissociation mechanism of LH1 varies depending on pressure. Based on analogy with other phosphocholines,[14] we propose that phase transitions of the detergent DHPC may cause these shifts in the mechanism. Any detergent phase transition was, however, not visually distinguishable under the microscope nor were there any changes in scattering according to the absorption spectra. It appears that dissociation to heterodimeric B825 subunits occurs via an

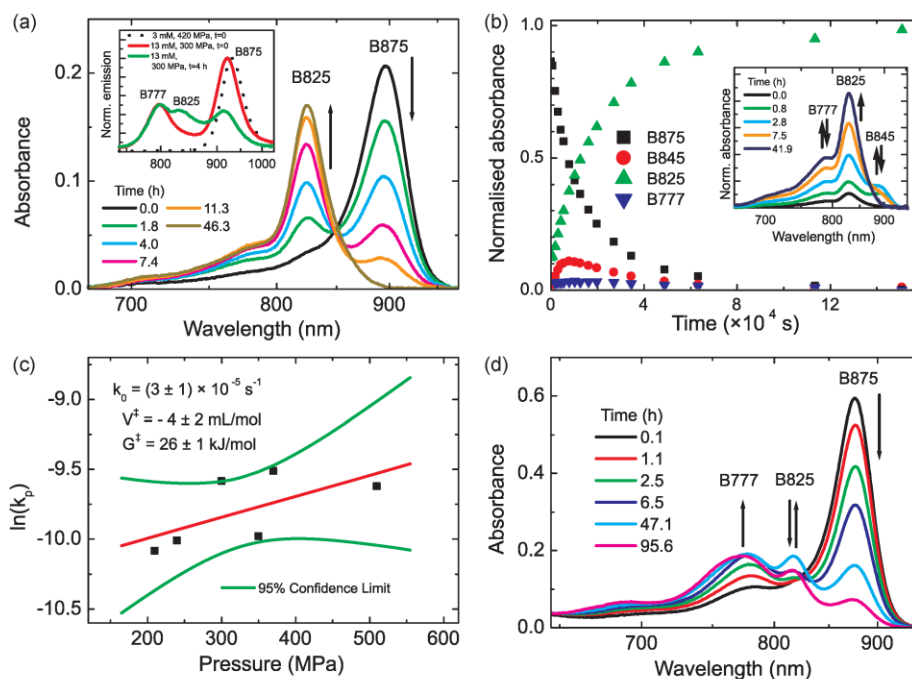


Figure 1. (a) Time dependence of the area-normalised absorption spectra of isolated LH1 complexes from *Rb. sphaeroides* at 13 mM DHPC concentration, temperature of 302 K and constant 240 MPa pressure. Arrows indicate the direction of the changing band intensity. Inset demonstrates the peak-normalised fluorescence spectra (excitation at 635 nm) at 300 MPa pressure, measured initially and after 4 h of dissociation. A reference spectrum at 3 mM DHPC and 420 MPa is included. (b) B875, B845, B825, and B777 band area-normalised absorbance over time at 520 MPa pressure. Inset demonstrates time dependence of the area-normalised absorption spectra with B875 band subtracted for clarity. (c) Pressure dependence of the reaction rate constant. Inset demonstrates the respective pseudo-first-order reaction kinetics. (d) Time dependence of the area-normalised absorption spectra at atmospheric pressure.



intermediary, which we propose to be a tetrameric ( $\alpha_2\beta_2\text{Bchl}_4$ ) subunit B845, first described as B851 under titration with detergent by Végé and Robert [15] in *Rs. rubrum*. This spectral component was also present in the work of Visschers et al. [16].

Figure 1(b) shows the changes in normalised absorbance of the intact LH1(B875) and its subunits B845, B825 and B777 ( $\alpha\text{Bchl}$  and  $\beta\text{Bchl}$ ) during the dissociation process at 520 MPa. As seen, the dissociation equilibrium is strongly shifted towards B825. The inset demonstrates the accumulation and loss of the intermediary B845 as its absorption band changes.

Between  $\sim 200$  and  $500$  MPa, the dissociation mechanism corresponds to a pseudo-first-order reaction, which is characterised by kinetic parameters: apparent reaction rate at atmospheric pressure  $k_0 = (3 \pm 1) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , activation volume  $\Delta V^\ddagger = -4 \pm 2 \text{ mL/mol}$ , and free energy of activation  $\Delta G^\ddagger = 26 \pm 1 \text{ kJ/mol}$  (Figure 1(c)). The half-life of LH1 under these conditions was between 2.6 and 4.3 h depending on pressure. The negative value of the activation volume implies that the rate of the dissociation process increases with pressure. Under pressures of  $\sim 50$ – $200$  MPa the dissociation appears to follow a second-order reaction kinetics. Below  $\sim 50$  MPa and over  $\sim 500$  MPa, the reaction mechanism for dissociation is more complex, corresponding to higher order kinetics.

It has been previously shown in *Rs. rubrum* that at atmospheric pressure the heterodimers B820 dissociate further into monomers B777 ( $\alpha\text{Bchl}$  and  $\beta\text{Bchl}$ ) via an increase in detergent concentration. [8] An experiment performed in a cuvette under atmospheric pressure and ambient temperature of  $298 \pm 1 \text{ K}$  confirmed this result for our samples. As seen in Figure 1(d), LH1 may dissociate via a two-step mechanism resulting in monomers B777. It is interesting to note that Figure 1(d) also indicates the formation of bacteriopheophytin from B777, which is visible as a gradual blue shift in the absorption spectrum, as well as of an oxidation product of BChl [17] at 690 nm. While under the minimal pressure the heterodimers dissociate into the monomers, the equilibrium is tilted in the other direction under higher pressures, and the monomers B777 apparently (re)integrate into the B825 heterodimers (Figure 1(b)).

The combined results allow forming the following complex reaction scheme for the dissociation of LH1:  $\text{B875} \rightleftharpoons \text{B845} \rightleftharpoons \text{B825} \rightleftharpoons \text{B777}$ .

## Acknowledgements

The authors would like to thank C. N. Hunter and his research group from the University of Sheffield for the preparation and purification of the LH1 sample, and M. Rätsep, K. Leiger and H. Salujärv for their expert technical assistance.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by the Estonian Research Council under [Grant IUT02-28].

## References

- [1] Freiberg A, Ellervee A, Kukk P, Laisaar A, Tars M, Timpmann K. Pressure effects on spectra of photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes. *Chem Phys Lett.* 1993;214:10–16.
- [2] Jungas C, Ranck J-L, Rigaud J-L, Joliot P, Verméglio A. Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.* 1999;18:534–542.
- [3] Qian P, Hunter CN, Bullough PA. The 8.5 Å projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Biol.* 2005;349:948–960.

- [4] Bahatyrova S, Frese RN, van der Werf KO, Otto C, Hunter CN, Olsen JD. Flexibility and size heterogeneity of the LH1 light harvesting complex revealed by atomic force microscopy: functional significance for bacterial photosynthesis. *J Biol Chem*. 2004;279:21327–21333.
- [5] Chang MC, Meyer L, Loach PA. Isolation and characterization of a structural subunit from the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 and puc705-BA. *Photochem Photobiol*. 1990;52:873–881.
- [6] Wang Z-Y, Muraoka Y, Nagao M, Shibayama M, Kobayashi M, Nozawa T. Determination of the B820 subunit size of a bacterial core light-harvesting complex by small-angle neutron scattering. *Biochemistry*. 2003;42:11555–11560.
- [7] Qian P, Papiz MZ., Jackson PJ, Brindley AA, Ng IW, Olsen JD, Dickman MJ, Bullough PA, Hunter CN. Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. *Biochemistry*. 2013;52:7575–7585.
- [8] Parkes-Loach P, Riccobono J, Loach P. Preparation of subunit forms of the light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum*. In: Biggens J, editor. *Progress in photosynthesis research II*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers; 1987. p. 25–28.
- [9] Pandit A, Visschers RW, van Stokkum IHM, Kraayenhof R, van Grondelle R. Oligomerization of light-harvesting I antenna peptides of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*. 2001;40:12913–12924.
- [10] Linke K, Periasamy N, Ehrmann M, Winter R, Vogel RF. Influence of high pressure on the dimerization of ToxR, a protein involved in bacterial signal transduction. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:7821–7823.
- [11] Jones MR, Fowler GJS, Gibson LCD, Grief GG, Olsen JD, Crielaard W, Hunter CN. Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes. *Mol Microbiol*. 1992;6:1173–1184.
- [12] Freiberg A, Kangur L, Olsen JD, Hunter CN. Structural implications of hydrogen-bond energetics in membrane proteins revealed by high-pressure spectroscopy. *Biophys J*. 2012;103:2352–2360.
- [13] Grasset O. Calibration of the R ruby fluorescence lines in the pressure range [0–1 GPa] and the temperature range [250–300 K]. *High Pressure Res*. 2001;21:139–157.
- [14] Matsuki H, Kusube M, Hata T, Kaneshina S. Barotropic and Thermotropic phase behavior of bilayer membranes composed of phospholipids containing Cis double bond in the sn-2 Acyl chain. In: Winter R, editor. *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II*. Berlin: Springer-Verlag; 2003. p. 199–202.
- [15] Végh AP, Robert B. Spectroscopic characterisation of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett*. 2002;528:222–226.
- [16] Visschers RW, Nunn R, Calkoen F, van Mourik F, Hunter CN, Rice DW, van Grondelle R. Spectroscopic characterization of B820 subunits from light-harvesting complex I of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides* prepared with the detergent n-octyl-rac-2,3-dipropylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1100:259–266.
- [17] Makhneva ZK, Erokhin YE, Moskalenko AA. Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800-850 in *Allochrodatum minutissimum* cells. *Dokl Biochem Biophys*. 2007;416:256–259.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Marit Puusepp

(sünnikuupäev: 15.08.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“Fotosünteesilist päritolu oligomeersete membraanivalkude barospektroskoopiline uurimus”,

mille juhendajad on dr Liina Kangur ja prof Arvi Freiberg,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2015**